

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 15 日 (15.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/031380 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/00, 5/00, C07K 14/74, 19/00, C12P 21/02, A61K 48/00, 38/00, 45/00, A61P 31/00, 35/00, 37/04, 43/00
- (74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012595
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 1 日 (01.10.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-288394 2002 年 10 月 1 日 (01.10.2002) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岩本 愛吉 (IWAMOTO, Aikichi) [JP/JP]; 〒113-0022 東京都 文京区 千駄木 5-1 6-1 0 Tokyo (JP). 立川 愛 (TACHIKAWA, Ai) [JP/JP]; 〒154-0016 東京都 世田谷区 弦巻 1-8-2 1-2 0 8 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF STRENGTHENING FOREIGN EPITOPE PRESENTATION BY MHC CLASS I BY INHIBITING TAP ACTIVITY

(54) 発明の名称: TAP活性の阻害により MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法

(57) Abstract: A method of strengthening the presentation of a foreign epitope by MHC class I by inhibiting TAP activity. A mammalian cell-infecting viral vector encoding both of a TAP inhibitor and epitope-binding  $\beta$  2m is constructed and transferred into mammalian cells. Thus, endogenous MHC class I/peptide complexes are decreased by the TAP inhibitor and MHC class I/peptide complexes containing epitope-binding  $\beta$  2m expressed from the vector are successfully presented on the cell surface at a high frequency. This method is useful in the vaccine therapy for infection and cancer.

(57) 要約: 本発明は、TAP活性を阻害することにより MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法に関する。TAP阻害因子とエピトープ結合  $\beta$  2m を共にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを構築し、哺乳動物細胞に導入した。TAP阻害因子により内因性の MHC class I/ペプチド複合体を減少させ、ベクターから発現させたエピトープ結合  $\beta$  2m を含む MHC class I/ペプチド複合体を高頻度に細胞表面に提示させることに成功した。本発明は、感染症や癌などにおけるワクチン療法において有用である。

WO 2004/031380 A1

## 明細書

TAP活性の阻害により MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法

### 技術分野

本発明は、TAP活性の阻害により MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法に関する。

### 背景技術

MHC (major histocompatibility complex) class I分子は重鎖 (heavy chain; HC) と  $\beta 2$ ミクログロブリン ( $\beta 2$ -microglobulin;  $\beta 2m$ ) からなるヘテロダイマーであり、体内にあるほとんどの細胞がその細胞膜表面上に持つ。MHC class I分子はその重鎖によって作られるペプチド収容溝に10アミノ酸前後からなるペプチドを収容することができ、そのMHC class I/ペプチド複合体が細胞性免疫の担い手である細胞傷害性T細胞 (CTL) 上の T cell receptor (TCR) によって認識されることから、MHC class I分子によって提示されるペプチドは「エピトープ (epitope; 抗原決定基)」と呼ばれる。

細胞質内で作られた自己抗原、あるいはウイルス抗原、腫瘍抗原などに由来するペプチド断片は TAP (transporter associated with antigen processing) と呼ばれる粗面小胞体上にあるトランスポーターを介して粗面小胞体へと運ばれ、そこでMHC class I重鎖および  $\beta 2m$ とともに安定なMHC class I/ペプチド複合体を形成する。 $\beta 2$ -ミクログロブリン分子はMHC class Iの立体構造の安定性の確保とH鎖の細胞表面への輸送に役割を果たしている (日本分子生物学会編「免疫系: 認識・分化・増殖」本庶 佑、渡邊 武 編集、丸善株式会社、117-118ページ)。ペプチドを結合していない空のMHC class I分子は37℃の培養条件では非常に不安定であることが知られている。

MHC class I分子によって提示されるペプチドであるエピトープは、ある抗原に対する特異的な細胞性免疫を誘導するのに非常に重要な分子であり、HIVをはじめとするウイルス感染や、癌に対する免疫治療としてペプチドワクチンの開発が試みられている。しかしながら多くのウイルス抗原や腫瘍抗原由来の主要なエピトープは、MHC class I分子とペプチドとの結合が弱く、ペプチドのみをワクチンとして使用してもその安定性の低さから一般に効果が期待できない。これまでに抗原性を損なわずMHC class I分子との結合を高めるアミノ酸置換を行った人工のエピトープを用いた、メラノーマ患者に対する臨床研究では効果が認められているが、このような安定性、抗原性に優れたエピトープを同定、開発することは煩雑で困難であり、必ずしも目的のものが得られるわけではない。

また一方で $\beta 2m$ によるMHC class I分子上のペプチドの安定性の増加という現象が知られており、その $\beta 2m$ のアジュバント効果を利用した系の開発も行われている。

近年、エピトープペプチドをMHC class I およびII分子あるいは $\beta 2m$ に融合させたMHC class I/ペプチド複合体の発現が試みられている (Uger, R. A. and Barber, B. H., 1998, J. Immunol. 160: 1598-1605; White, J. et al., 1999, J. Immunol. 162: 2671-2676; Kang, X. et al., 1997, Cancer Res. 57: 202-205; Uger, R. A. et al., J. Immunol. 1999, 162: 6024-6028; 米国特許第5,869,270号)。これらの系では、 $\beta 2m$ のN末端にリンカーを介してエピトープのペプチド配列を融合させること (エピトープ結合 $\beta 2m$ ; epitope-linked- $\beta 2m$ ) (" $e/\beta 2m$ "とも表記する) によって、特にMHC class I分子との結合力の弱いエピトープに関してペプチド単独に比して安定性が増加しCTLによる認識も高まることが報告されている。

現在ヒトの MHC class I分子について用いられている MHC class I/ペプチド複合体は、大腸菌にて重鎖(HC)および $\beta 2m$ 蛋白質を別々に発現させ、精製し、さらに合成ペプチドを用いた3者によるインビトロフォールディングにてMHC class I

/ペプチド複合体を作製している。それに対してマウスのMHC class I分子についてバキュロウイルスベクターを用い、昆虫細胞由来のMHC class I/ペプチド複合体の作製が報告されている(White, J. et al., 1999, J. Immunol. 162: 2671-2676)。この系ではMHC class I重鎖、エピトープ結合 $\beta 2m$ を各々発現するバキュロウイルスを重感染させることによって、その細胞内でMHC class I/ペプチド複合体が作られる。バキュロウイルスベクターは昆虫細胞(例えばSf9細胞)で有効なプロモーターの下流で外来遺伝子を発現するシステム(特表平6-502990)であるため、哺乳類由来の細胞を利用することは困難である。また、PunnonenらはDNAシャッフリングに用いる遺伝子ワクチンベクターを開示しているが、エピトープを融合させたMHC class I重鎖または $\beta 2m$ については記載されていない(Punnonen, J. 他、Genetic Vaccine Vector Engineering、米国特許出願第20010006950号)。

### 発明の開示

本発明は、TAP活性の阻害により MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、遺伝子組み換えによりエピトープを結合した $\beta 2m$ をコードする遺伝子を構築し、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いてこのエピトープ結合 $\beta 2m$ を哺乳動物細胞で発現させて、これらの細胞においてMHC class I/ペプチド複合体を生産させる系の開発を行った。しかし、哺乳動物の細胞表面には多数のMHC class I分子が存在しており、それぞれのMHC class I分子は細胞内に存在するタンパク質由来の様々なペプチドを提示しているため、エピトープ結合 $\beta 2m$ を哺乳動物細胞で発現させた場合、このエピトープ結合 $\beta 2m$ と複合体を形成するMHC class I分子の割合はその分低下してしまう。

本発明者らは、目的のエピトープを提示したMHC class I分子の頻度を高めることは、免疫誘導にとって極めて重要だと考えた。例えば、MHC class I/ペプチド



複合体を用いた抗原特異的CTLの頻度の定量において、“MHC class I/ペプチド・テトラメリック複合体（テトラマー）” [MHC class I/peptide tetrameric complex (tetramer)] を用いる方法が開発されている (Altman J. D. et al., Science 274: 94-96 (1996))。これはMHC class I/ペプチド複合体をbiotin-avidinの結合を用いて4量体化し、さらに蛍光標識を付加したもので、FACSによる解析に利用される。この方法は個体から分離した末梢血単核球をそのまま用いて測定することができるため、簡便で個体内の頻度を直接反映する上、非常に感度がよく、さらに特異性も高いことが確認されている (Wilson, J. D. K. et al., J. Exp. Med. 188: 785-790 (1998); Kuroda, M. J. et al., J. Exp. Med. 187: 1373-1381 (1998))。本発明者らは、上記に示したMHC class I/ペプチド複合体の解析においては、当初試みられていた単量体のMHC class I/ペプチド複合体では1:1のMHC class I/ペプチド複合体とTCRの結合力が弱いためFACSによる解析が不可能であったが、それをテトラマーにすること、つまり複数のMHC class I/ペプチド複合体 - TCRの結合が同時に存在することによってはじめて解析が可能になったという経緯に注目した。

また、上記のエピトープ結合 $\beta 2m$ を哺乳動物細胞で発現させる系においても、細胞内に存在するタンパク質由来の様々なペプチドを提示させたままにしておくことにより、目的のエピトープを提示しているMHC class I/ペプチド複合体が近傍に存在する確率が低下する可能性がある。

以上の二つの点を考えあわせることで、本発明者らは、一つの細胞膜上のMHC class I/ペプチド複合体上に同じエピトープを高率に提示させることができれば、TCRによる認識もより効率よく行われる、すなわちCTLを効率良く活性化できると考えた。例えば、これまでも細胞表面を酸処理することによって、提示されているMHC class I/ペプチド複合体上のペプチドをはがし、洗い流した後に単一の合成ペプチドを高濃度に加えるとCTLを効率良く活性化できるという報告がある (Langlade-Demoyen, P. et al., 1994, Int. Immunol. 6: 1759-1766)。しかしな

がらこのような操作は試験管内では可能であるが、実際の個体内では不可能であり、かつ上記のようにペプチドの安定性は低いことを考えると免疫治療への応用は難しい。

そこで本発明者らは、TAPを介したペプチド輸送を阻害する分子を用いて細胞由来の抗原提示を阻害し、 $\beta 2m$ に融合した目的のエピトープのみを抗原提示させようと考えた。まず、TAP阻害因子として知られる単純ヘルペスI型ウイルス (HSV-1) 由来のICP47 (Hill, A. et al., 1995, Nature 375: 411-415; Fruh, K. et al., 1995, Nature 375: 415-418) およびヒトサイトメガロウイルス (CMV) のUS6 (Ahn, K. et al., 1997, Immunity 6: 613-621; Hengel, H. et al., 1997, Immunity 6: 623-632) を発現する組み換えセンダイウイルス (SeV) ベクターを構築した。このベクターを、ヒトCD4陽性Tリンパ球株 H9、およびMT-2に導入し、フローサイトメトリーにより細胞表面上のMHC class I/ペプチド複合体を解析した。その結果、対照の野生型SeVを感染させた細胞ではMHC class I/ペプチド複合体レベルに有意な変化は検出されなかったが、TAP阻害分子 US6 を発現するSeVベクターを感染させた細胞では、時間と共にMHC class I/ペプチド複合体レベルが減少し、新規 (de novo) のMHC class I/ペプチド複合体の発現が抑制されていることが示された。

次に、ICP47またはUS6を発現するSeVベクターを上記細胞に感染後、さらに酸処理を行って細胞表面上に発現するエピトープを解離させた。この処理により、細胞表面上にもともと存在するMHC class I/ペプチド複合体をより効率的に減少させることが可能であった。さらに本発明者らは、エピトープ結合  $\beta 2m$ と同時にTAP阻害分子を細胞内に発現させることによって、細胞表面上の単一エピトープを持つMHC class I/ペプチド複合体の高率な発現を試みた。そのために本発明者らは、TAP阻害分子 (US6) とエピトープ結合  $\beta 2m$ を共発現するベクターを構築した。ベクターから発現されるエピトープは  $\beta 2m$ と融合しているため、TAPとは無関係に粗面小胞体内に存在することができる。このベクターを用い、TAP阻害因子の効果

により内在性蛋白質由来のペプチドを提示するMHC class I/ペプチド複合体を減少させ、目的の外来エピトープが結合した $\beta 2m$ を含むMHC class I/ペプチド複合体を高頻度で発現させることに成功した。このように、「細胞表面上の単一ペプチドを持つMHC class I/ペプチド複合体の高率な発現」に関してTAP阻害分子を用いた系は本発明により初めて提供されたまったく新しい概念であり、免疫治療ワクチンとして期待が持たれる。

本発明により、目的のエピトープ結合 $\beta 2m$ を含むMHC class I/ペプチド複合体を、哺乳動物細胞において高い純度で発現させることが可能となる。例えば、実施例に示すようなエピトープを結合した $\beta 2m$ またはMHC class I重鎖を発現する哺乳動物細胞感染性のウイルスベクターを細胞に導入し、TAP阻害剤存在下で発現させることにより、導入遺伝子から発現されるエピトープを含むMHC class I/ペプチド複合体を優先的に細胞表面に形成させることができる。

実施例に示すように、エピトープ結合 $\beta 2m$  (HIV-1 Nefタンパク由来のエピトープが結合している $\beta 2m$ ) とMHC class I重鎖 (HLA-A\*2402) とを共発現させた細胞は、HIV-1 Nefタンパク由来の合成エピトープペプチドをパルス投与した場合と同等またはそれ以上の効率で抗原特異的CTLに認識される。また、エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するSeVベクター導入細胞から回収したエピトープ結合 $\beta 2m$ は、エピトープ結合 $\beta 2m$ を標的細胞の培養液に添加することによって、標的細胞に対する抗原特異的CTLの反応を誘導する。これらの知見は、エピトープ結合 $\beta 2m$ をコードするベクターが、抗原特異的な免疫反応を誘導するためのインビボまたはエクスビボにおける遺伝子治療に有用であることを示している。ここにTAP阻害剤を用いることにより、さらに高純度で目的のエピトープを提示させることが可能となる。TAP阻害蛋白質の存在下で目的のMHC class I/ペプチド複合体を個体内で産生させれば、極めて効果の高い免疫治療を実現することが可能と考えられる。

このように本発明者らは、TAPの阻害を介して内因性のエピトープの提示を阻害することによって、効率的に外来エピトープを提示させる方法確立した。TAP阻

害剤の存在下でエピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ を発現するベクターをインビボおよびエクシビボで導入することにより、抗原特異的細胞性免疫を誘導することが可能になる。本発明の方法は、例えばウイルスやバクテリア等の感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法などに有用である。

すなわち本発明は、TAP活性を阻害することにより MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法に関し、より具体的には、

(1) MHC class Iによる外来エピトープの提示を増強する方法であって、

(a) 細胞のTAP活性を阻害する工程、および

(b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程、を含む方法、

(2) 酸処理を行う工程をさらに含む、(1)に記載の方法、

(3) 細胞のTAP活性を阻害する工程が、TAP阻害活性を有する蛋白質を該細胞に接触させる工程または、該蛋白質をコードするベクターを該細胞へ導入する工程である、(1)または(2)に記載の方法、

(4) TAP阻害活性を有する蛋白質がUS6またはICP47である、(3)に記載の方法、

(5) ベクターが哺乳動物細胞に感染可能なウイルスベクターである、(3)に記載の方法、

(6) ベクターがセンダイウイルスベクターである、(5)に記載の方法、

(7) (i) TAP遺伝子の発現が阻害されているか、TAP阻害剤を含むか、またはTAP阻害剤をコードする遺伝子を発現可能に保持し、かつ(ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞、

(8) (i) TAP阻害剤または該阻害剤を発現可能なベクター、および(ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ 、ま

たはエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を発現可能なベクター、を含むエピトープを提示させるためのキット、

(9) 下記 (i) および (ii) の両方を発現可能なベクター；

(i) TAP阻害剤、および

(ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ 、に関する。

本発明は、TAP活性を阻害することにより MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法を提供する。本発明の方法は、具体的には、(a) 細胞のTAP活性を阻害する工程、および (b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程、を含む方法である。工程 (a) および (b) の順序に制限はなく、上記方法には、(a) または (b) のどちらを先に行った場合も、また同時に行った場合も含まれる。TAPとは、ATP結合カセットファミリーに属する分子で、TAP-1およびTAP-2の2種類がある。

ヒトTAP-1遺伝子は、例えばAccession NM\_000593 (配列番号:47) (protein ID NP\_000584 (配列番号:48)) を参照のこと (Garbi, N. et al., Eur. J. Immunol. 33, 264-273 (2003); Heintke, S. et al., FEBS Lett. 533, 42-46 (2003); Ozbas-Gerceker, F. et al., Turk J Pediatr 44, 91-97 (2002); Seliger, B. et al., Int. J. Oncol. 20, 349-353 (2002); Saveanu, L. and Van Endert, P.M., Adv. Exp. Med. Biol. 495, 79-82 (2001); Chen, H.L. et al., Nat. Genet. 13, 210-213 (1996); Beck, S. et al., J. Mol. Biol. 255, 1-13 (1996); Jackson, D.G. and Capra, J.D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 11079-11083 (1993); Glynn, R. et al., Eur. J. Immunol. 23, 860-866 (1993); Beck, S. et al., J. Mol. Biol. 228, 433-441 (1992); Bodmer, J.G. et al., Tissue Antigens 39, 161-173 (1992); Bahram, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 10094-1

0098 (1991); Spies, T. et al., *Nature* 348, 744-747 (1990); Trowsdale, J. et al., *Nature* 348 (6303), 741-744 (1990))。TAP-1は、APT1, PSF1, ABC17, ABCB2, RING4, またはD6S114Eなどとも呼ばれる。また、例えばラットTAP-1遺伝子は、Accession NM\_032055 (protein ID NP\_114444) に記載されている (Rudolph, M.G. et al., *J. Mol. Biol.* 324, 975-990 (2002); Daumke, O. and Knittler, M. R., *Eur. J. Biochem.* 268, 4776-4786 (2001); Deverson, E.V. et al., *Nature* 348, 738-741 (1990))。マウスTAP-1遺伝子は、Accession NM\_013683 (protein ID NP\_038711) に記載されている (Garbi, N. et al., *Eur. J. Immunol.* 33, 264-273 (2003); Ruedl, C. et al., *Eur. J. Immunol.* 32, 818-825 (2002); Neveu, R. et al., *Mol. Immunol.* 38, 661-667 (2002); Marusina, K. et al., *J. Immunol.* 158, 5251-5256 (1997); Van Kaer, L. et al., *Cell* 71, 1205-1214 (1992); Hanson, I.M. and Trowsdale, J., *Immunogenetics* 34, 5-11 (1991); Cho, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5197-5201 (1991); Monaco, J.J. et al., *Science* 250 (4988), 1723-1726 (1990))。

ヒトTAP-2遺伝子は、例えばAccession NM\_000544 (配列番号:49) (protein ID NP\_000535 (配列番号:50)) に記載されている (Garbi, N. et al., *Eur. J. Immunol.* 33, 264-273 (2003); Heintke, S. et al., *FEBS Lett.* 533, 42-46 (2003); Ozbas-Gerceker, F. et al., *Turk J Pediatr* 44, 91-97 (2002); Penfornis, A. et al., *Hum. Immunol.* 63, 61-70 (2002); Saveanu, L. and Van Endert, P.M., *Adv. Exp. Med. Biol.* 495, 79-82 (2001); Yan, G. et al., *J. Immunol.* 162, 852-859 (1999); Cesari, M.M. et al., *Immunogenetics* 45, 280-281 (1997); Pattanakitsakul, S. et al., *Tissue Antigens* 47, 353-355 (1996); Beck, S. et al., *J. Mol. Biol.* 255, 1-13 (1996); Cano, P. and Baxter-Lowe, L.A., *Tissue Antigens* 45, 139-142 (1995); de la Salle, H. et al., *Science* 265, 237-241 (1994); Glynn, R. et al., *Eur. J. Immunol.* 23, 860-866 (1993); Powis, S.H. et al., *Immunogenetics* 37, 373-380 (1993); Beck, S. et al., *J. Mol. Biol.* 2

28, 433-441 (1992); Bodmer, J. G. et al., *Tissue Antigens* 39, 161-173 (1992); Powis, S. H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1463-1467 (1992); Kelly, A. et al., *Nature* 355, 641-644 (1992); Bahram, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10094-10098 (1991); Trowsdale, J. et al., *Nature* 348 (6303), 741-744 (1990)). TAP-2は、APT2, PSF2, ABC18, ABCB3, RING11, D6S217Eなどとも呼ばれる。また、マウスTAP-1遺伝子は、例えばAccession NM\_011530 (protein ID NP\_035660, P36371) に記載されている (Garbi, N. et al., *Eur. J. Immunol.* 33, 264-273 (2003); Marusina, K. et al., *J. Immunol.* 158, 5251-5256 (1997); Yang, Y. et al., *J. Biol. Chem.* 267, 11669-11672 (1992); Attaya, M. et al., *Nature* 355, 647-649 (1992); Monaco, J. J. et al., *Science* 250, 1723-1726 (1990))。ラットTAP-1遺伝子は、例えばAccession NM\_032056 (protein ID NP\_114445) に記載されている (Powis, S. J. et al., *Nature* 354, 528-531 (1991))。ウシTAP-1遺伝子は、例えばAccession NM\_174222 (protein ID NP\_776647) に記載されている (Ambagala, A. P. et al., *Immunogenetics* 54, 30-38 (2002))。

TAP-1遺伝子およびTAP-2遺伝子には、多型が存在する。これらの多型は全て本発明においてそれぞれTAP1-1遺伝子およびTAP-2遺伝子に含まれる。具体的には、本発明においてTAP-1遺伝子およびTAP-2遺伝子には、それぞれ上記に示した哺乳動物TAP-1蛋白質 (NP\_000584、NP\_114444、またはNP\_038711など) および哺乳動物TAP-2蛋白質 (NP\_000535、NP\_035660、P36371、NP\_114445、またはNP\_776647など) と、アミノ酸配列において68%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする核酸が含まれる。これらの蛋白質は、エピトープのプロセッシングに関与している。

アミノ酸配列の同一性は、例えばBLASTPプログラム (Altschul, S. F. et al.,

1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410) を用いて決定することができる。例えばNCBI (National Center for Biothchnology Information) のBLASTのウェブページにおいてLow complexityを含むフィルターは全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて検索を行う (Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7:649-656) 。例えば2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム (Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、例えば哺乳動物TAP-1蛋白質 (NP\_000584、NP\_114444、またはNP\_038711など) および哺乳動物TAP-2蛋白質 (NP\_000535、NP\_035660、P36371、NP\_114445、またはNP\_776647など) のアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算すればよい。

また、本発明においてTAP-1およびTAP-2遺伝子には、それぞれ上記に示した哺乳動物TAP-1遺伝子 (NM\_000593、NM\_032055、またはNM\_013683など) および哺乳動物TAP-2遺伝子 (NM\_000544、NM\_011530、NM\_032056、またはNM\_174222など) の蛋白質コード配列の30塩基以上、より好ましくは50塩基以上、より好ましくは100塩基以上、より好ましくは150塩基以上、より好ましくはコード配列全長と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸が挙げられる。ハイブリダイゼーションにおいては、哺乳動物TAP-1または2遺伝子のコード配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5xSSC (1xSSCは 150 mM 塩化ナトリウムおよび 15 mM クエン酸ナトリウムを含む) 、7%(w/v) SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、100  $\mu$ g/ml 変性サケ精子DNA、5xデンハルト液 (1xデンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、およ



び0.2%フィコールを含む)を含む溶液中、48℃、好ましくは50℃、より好ましくは55℃、より好ましくは60℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度で2xSSC, 0.1% (w/v) SDS中、好ましくは1xSSC, 0.1% (w/v) SDS中、より好ましくは0.5xSSC, 0.1% (w/v) SDS中、より好ましくは0.1xSSC, 0.1% (w/v) SDS中で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

TAP-1とTAP-2は双方とも膜貫通ドメインを持ち、小胞体膜上でヘテロダイマーを形成してトランスポーターの機能を発揮する。この2つのどちらが欠けてもMHC class I分子による抗原提示はできなくなる。細胞質内でプロセッシングを受けたペプチドはTAPトランスポーターによってATP依存性に小胞体内へと輸送され、そこでMHC class I分子と結合する。本発明においてTAPには、TAP-1およびTAP-2が含まれる。またTAP活性の阻害は、TAP-1および/またはTAP-2の活性の阻害が含まれる。TAP活性の阻害は、直接または間接であってよい。例えば、TAP活性の阻害には、TAPに直接作用する阻害剤を適用してTAPの活性を阻害すること、およびTAPの発現（転写または翻訳）の抑制により間接的にTAP活性を阻害することが含まれる。TAPの発現の阻害は、TAP遺伝子のアンチセンス核酸を細胞で発現させたり、あるいはTAP遺伝子の転写産物を切断するリボザイムを細胞で発現させることにより実施することができる。また、TAP遺伝子の転写産物の一部の相補配列を含む2本鎖RNA部分を持つ核酸を用いて、（RNA interference ; RNA干渉）によりTAP遺伝子の発現を阻害してもよい。これらは全て、本発明においてTAP阻害剤となる。

一般的にRNAiとは、標的遺伝子のmRNA配列の一部と相同な配列からなるセンスRNAおよびこれと相補的な配列からなるアンチセンスRNAを含むRNAを細胞内に導入または発現させることにより、標的遺伝子mRNAの破壊を誘導し、標的遺伝子の発現が阻害される現象を言う（Genes Dev. 2001, 15:188-200; Elbashir, SM et al. (2001) Nature 411:494-498）。RNAi効果を持つ2本鎖RNAが細胞内に導入されると、DICERといわれる酵素（RNase III核酸分解酵素ファミリーの一種）が2本鎖RNAと接触し、2本鎖RNAがsmall interfering RNA (siRNA) と呼ばれる小さな断片に

分解される。本発明においてsiRNAは、このような細胞内プロセッシングにより生成したRNAに加え、RNAiにより標的遺伝子の発現を阻害するために人工的に合成または発現させたRNA分子もsiRNAと総称する。本発明におけるRNAi効果を有するRNAには、これらのsiRNAが含まれる。siRNAにより、インビボにおいて標的遺伝子の発現を抑制することができる (Anton P. et al., Nature Vol. 418 38-39 2002; David L. et al., Nature genetics Vol. 32 107-108, 2002)。

ある標的遺伝子に対するsiRNAは、通常、この遺伝子の転写配列 (mRNA配列) における連続する15塩基以上の配列 (より好ましくは16塩基以上、17塩基以上、18塩基以上、または19塩基以上の配列)、およびその相補配列を含み、これらの配列がハイブリダイズして2本鎖を形成するRNAである。好ましくは、連続する19~30塩基、より好ましくは20~25塩基の配列、より好ましくは21~23塩基の配列またはその相補配列を片方の鎖に含み、これと相補対を形成するようなもう一方の鎖を含むRNAである。しかし、より長い配列を含むRNAであっても、細胞において、RNAi効果を有するsiRNAへ分解されることが期待されるため、RNAの長さは特に制限されない。また、標的遺伝子のmRNAの全長もしくはほぼ全長の領域に対応する長鎖二本鎖RNAを、例えば、予めDICERで分解させ、その分解産物を利用することも可能である。この分解産物には、RNAi効果を有するRNA分子 (siRNA) が含まれることが期待される。この方法によれば、RNAi効果を有することが期待されるmRNA上の領域を、特に選択しなくともよい。即ち、標的遺伝子のRNAi効果を有する配列は、必ずしも正確に規定される必要はない。

通常、末端に数塩基のオーバーハングを有する2本鎖RNAは、RNAi効果が高いことが知られている。本発明において用いるsiRNAは、必須ではないが、末端 (好ましくは3'末端) に数塩基のオーバーハングを有することが望ましい。このオーバーハングを形成する塩基の長さは特に制限されないが、好ましくは、2塩基のオーバーハングである。本発明においては例えば、TT (チミンが2個)、UU (ウラシルが2個)、その他の塩基のオーバーハングを有する2本鎖RNA (最も好ましくは19塩

基対の2本鎖RNA部分と2塩基(TT)のオーバーハングを有する分子)を好適に用いることができる。本発明のsiRNAには、このようにオーバーハングを形成する塩基がDNAであるような分子も含まれる。

また、siRNAにおいて塩基対を形成する2つの鎖は、スペーサーを介して連結されていてもよい。すなわち、このスペーサーがループを形成して、その前後のRNA配列同士がアニールして2本鎖を形成するRNAも好適に用いることができる。スペーサーの長さに制限はないが、例えば3～23塩基としてよい。

また、上記のsiRNAを発現し得るベクターもまた、本発明において使用することができる。即ち本発明は、RNAi効果を持つRNAを発現し得るベクターの使用に関する。上記RNAを発現し得るベクターは、例えば2本鎖からなるsiRNAの一方の鎖と他方の鎖が別々に発現するように、それぞれ別々のプロモーターと連結した核酸であってよい。あるいは選択的スプライシング等により1つのプロモーターから2種のRNAが転写されるようにしてもよい。あるいは、センス鎖とアンチセンス鎖がスペーサー（ループを形成する）を介して連結された一本鎖RNAを発現するベクターであってもよい。このベクターから発現したRNAは、RNAi効果を持つRNAステムを形成して標的遺伝子の発現を抑制する。ステムの長さは上記のsiRNAと同様であるが、例えば19～29塩基としてよい。スペーサーの長さに制限はないが、例えば3～23塩基としてよい。5'および/または3'に数塩基のオーバーハングを有していても、いなくてもよい。これらのベクターは、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術により、容易に作製することができる (Brummelkamp TR et al. (2002) Science 296: 550-553; Lee NS et al. (2001) Nature Biotechnology 19: 500-505; Miyagishi M & Taira K (2002) Nature Biotechnology 19: 497-500; Paddison PJ et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 1443-1448; Paul CP et al. (2002) Nature Biotechnology 19: 505-508; Sui G et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99(8): 5515-5520; Proc Natl Acad Sci USA 99: 14943-14945, 2002; Paddison, PJ et al. (2002) Genes Dev. 16:948-958)。より具体的には

、目的のRNA配列をコードするDNAを公知の種々の発現ベクターへ適宜挿入することによって構築することが可能である。プロモーターとしては、RNAポリメラーゼIIIプロモーターなどを好適に用いることができる。具体的には、例えばU6 Pol I IIプロモーター、およびH1 RNAプロモーター（H1 RNAはRNasePを構成する一成分である）などが利用できる。

以下に、好ましいsiRNAの一例を例示するが、本発明において用いられ得るsiRNAはこれらに限定されない。まず、標的遺伝子の開始コドンから、50塩基以上、好ましくは60塩基以上、より好ましくは70塩基以上下流の転写配列領域を選択する。該領域から、好ましくはAA配列を見つけ、該AAに続く17～20ヌクレオチド（例えばAAに続く19ヌクレオチド）を選択する。AAの次の塩基は特に制限はないが、GまたはCである配列が好適には選択される。ここで、選択する配列のGC含量は、20～80%であることが好ましく、より好ましくは30～70%、より好ましくは35～65%である。また、選択した配列は、siRNAを投与する組織で発現する遺伝子の中で、標的遺伝子に特異的な配列であることが好ましい。例えば、公共の遺伝子配列データベースで選択配列をqueryにして検索し、投与個体の遺伝子の中で標的遺伝子以外に同一の配列を転写配列に持つ遺伝子が存在しないことを確認することが好ましい。また配列は、標的遺伝子の蛋白質コード配列（CDS）内から選択することが好ましい。このようにして選択された配列の初めのAAを除く配列を含む配列（好ましくは、3'にUUまたはTTが付加されている）、およびその相補配列（好ましくは3'にUUまたはTTを有する）は、好適なsiRNAとなる。またAAに続く配列を探す代わりに、CAに続く配列を上記と同様に探してもよい。あるいはAAまたはCA以外の配列であってもよい。複数種作製されたsiRNAから、最適なRNAi効果を有するRNAを適宜選択することも可能である。

RNAi効果を有するRNAは、当業者においては標的遺伝子の塩基配列を基に、適宜作製することができる。標的となるTAP遺伝子の塩基配列は、上述のように公共の遺伝子データベースから容易に取得することができるし、既知のTAP遺伝子をプロ

ープに、哺乳動物のcDNAライブラリーをスクリーニングしたり、あるいはRT-PCRにより取得することができる。得られた遺伝子の塩基配列を基に、上記の説明に従ってsiRNAを設計することができる。

標的となる遺伝子の配列は、必ずしも遺伝子全長の塩基配列が判明している必要はない。siRNAとして選択可能な任意の連続するRNA領域（例えば、20～30塩基）が判明していればよい。従って、EST（Expressed Sequence Tag）等のようにmRNAの一部は判明しているが、全長が判明していない遺伝子断片からも、該断片の塩基配列を基にsiRNAを作製することが可能である。合成したsiRNAを臨床に使用する場合、siRNAは修飾することができる。

また、アンチセンス核酸により遺伝子の発現を抑制する場合は、標的となるTAP遺伝子の転写される配列の連続した13ヌクレオチド以上、好ましくは14ヌクレオチド以上、さらに好ましくは15ヌクレオチド以上（18ヌクレオチド以上、20ヌクレオチド以上、または25ヌクレオチド以上）に対するアンチセンス配列を含む核酸であってよい。例えば、初期転写配列中のエクソン-イントロン境界、イントロン-エクソン境界、翻訳開始コドンを含む領域、5'端近傍の非翻訳領域、または成熟mRNA中の蛋白質コード配列（CDS）の連続した13ヌクレオチド以上、好ましくは14ヌクレオチド以上、さらに好ましくは15ヌクレオチド以上に対するアンチセンス配列を含む核酸などが好ましい。また臨床応用を考慮する場合、使用されるアンチセンス核酸は、通常、合成オリゴマーである。アンチセンス核酸はDNAであってよく、さらに修飾されていてもよい。例えば、ヌクレアーゼ分解に対する感受性を減らし、且つアンチセンス核酸としての活性を維持するために、リン酸エステル結合部のO（酸素）をS（硫黄）に置換したSオリゴ（ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド）の利用が一般に知られている。このSオリゴは現在ではアンチセンス薬として、直接患部に注入される臨床試験が行なわれている。本発明においてもこのSオリゴを好適に使用することができる。アンチセンス核酸の配列は、標的遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子

の発現を有効に抑制できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス核酸を用いて標的遺伝子の発現を効果的に抑制するには、アンチセンス核酸の長さは、好ましくは17塩基以上であり、より好ましくは20塩基以上、より好ましくは25塩基以上、より好ましくは30塩基以上、より好ましくは40塩基以上、より好ましくは50塩基以上であり、さらに好ましくは100塩基以上である。アンチセンスRNAは細胞内で発現させることもできる。標的細胞で活性を持つプロモーターの下流に目的のRNAをコードする核酸を連結したベクターを作製し、これを細胞に導入すればよい。

ベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、マイナス鎖RNAウイルスベクターなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどが利用できる。これらのベクター系または遺伝子導入用の担体を利用して、*ex vivo*法や*in vivo*法などにより患者へ投与を行う遺伝子治療が可能となる。

また、リボザイム、またはリボザイムをコードするベクターを利用してTAP遺伝子の発現を行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子を指す。リボザイムには種々の活性を有するものが存在し、RNAを部位特異的に切断するリボザイムの設計も可能である。リボザイムには、グループIイントロン型やRNase Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型(Rossi et al. (1991) *Pharmac. Ther.* 50: 245-254)やヘアピン型(Hampel et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 299-304, and U.S. Pat. No. 5,254,678)と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素、1990年、35、2191)。

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15という配列のC15の3'側を切断するが、その活性にはU14とA9との塩基対形成が重要とされ、C15の代わりにA15またはU15でも切断され得ることが示されている(Koizumi,

M.ら著、FEBS Lett、1988年、228、228.)。基質結合部位が標的部位近傍のRNA配列と相補的なリボザイムを設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムが作出できる (Koizumi, M.ら著、FEBS Lett、1988年、239、285.、小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素、1990年、35、2191.、Koizumi, M.ら著、Nucl Acids Res、1989年、17、7059.)。

また、ヘアピン型リボザイムも本発明の目的に有用である。このリボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される (Buzayan, JM., Nature, 1986年、323、349.)。ヘアピン型リボザイムからも、標的的特異的なRNA切断リボザイムを作出できることが示されている (Kikuchi, Y. & Sasaki, N., Nucl Acids Res, 1991, 19, 6751.、菊池洋, 化学と生物, 1992, 30, 112.)。このように、リボザイムを用いて標的遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を阻害することができる。

またTAP活性を阻害するには、TAP遺伝子に変異を導入したり、あるいはターゲティングによりTAP遺伝子を欠失させてもよい。本発明において「TAP活性を阻害する工程」は、TAP遺伝子の発現が欠損した細胞を提供または準備する工程であってもよい。本発明においてTAP阻害剤にはTAPの活性を直接または間接に阻害する化合物が含まれ、このようなアンチセンス核酸およびリボザイム、siRNA、さらにTAP遺伝子の発現を抑制する因子などもTAP阻害剤に含まれる。TAP阻害剤としては、TAPを阻害する活性を有する限り制限はなく、タンパク質、ペプチド性化合物、非ペプチド性化合物、核酸、核酸アナログ、低分子化合物などであってよい。

TAP阻害剤が核酸によりコードされうる場合は、該核酸を発現するベクターを細胞に導入することによりTAP阻害剤を発現させることができる。例えば、TAP阻害蛋白質としては、特に単純ヘルペスウイルス由来のICP47 (Hill, A. et al., 1995, Nature 375:411-415; Fruh, K. et al., 1995, Nature 375:415-418) およびサイトメガロウイルス由来のUS6 (Ahn, K. et al., 1997, Immunity 6:613-621; Hengel, H. et al., 1997, Immunity 6: 623-632) などが挙げられる。

具体的には、Human herpesvirus type 1のICP47は、Accession NC\_001806 (145311..145577の相補鎖) (配列番号:51) (protein ID NP\_044675、P03170 (配列番号:52)) に記載されている (Dolan, A. et al., J. Gen. Virol. 73 (Pt 4), 971-973 (1992); Perry, L. J. and McGeoch, D. J.; J. Gen. Virol. 69 (Pt 11), 2831-2846 (1988); McGeoch, D. J. et al., J. Gen. Virol. 69 (Pt 7), 1531-1574 (1988); McGeoch, D. J. et al., Nucleic Acids Res. 14 (4), 1727-1745 (1986); McGeoch, D. J. et al., J. Mol. Biol. 181 (1), 1-13 (1985))。また、Human herpesvirus type 2のICP47は、Accession NC\_001798 (147775..148035の相補鎖) (protein ID NP\_044543) に記載されている (Barnett, B. C. et al., J. Gen. Virol. 73 (Pt 8), 2167-2171 (1992); McGeoch, D. J. et al., J. Gen. Virol. 72 (Pt 12), 3057-3075 (1991); Everett, R. D. and Fenwick, M. L., J. Gen. Virol. 71 (Pt 6), 1387-1390 (1990); McGeoch, D. J. et al., J. Gen. Virol. 68 (Pt 1), 19-38 (1987))。

サイトメガロウイルスUS6については、例えばヒトCMV US6はAccession AY072775 (配列番号:53) (protein ID AAL67143 (配列番号:54)、NP\_040091)、チンパンジーCMV US6はAccession NC\_003521 (protein ID NP\_612779) に示されている (Davison, A. J. et al., J. Gen. Virol. 84 (Pt 1), 17-28 (2003))。

ICP47分子はTAP分子のペプチド結合部位と結合することによってTAPによるペプチドの輸送を阻害する (Tomazin, R. et al., 1996, EMBO J. 15:3256-3266)。一方、US6分子はTAP1へのATPの結合を阻害し、その結果ペプチドの輸送を阻害している (Hewitt, E. et al., 2001, EMBO J. 20:387-396)。これらのいずれの分子も、本発明においてTAP活性を阻害するために用いることができる。上記のウイルスは、複数の亜種や株等が存在するが、該当する遺伝子がコードする蛋白質がTAP阻害活性を持つ限り本発明において好適に用いることができる。また、これらの蛋白質は、野生型蛋白質に限らず、TAPを阻害する活性を有する限り、野生型から改変された蛋白質なども含まれる。例えば、TAP阻害活性を持つ部分ペプチドで



あってもよい。また、タグなどの他のポリペプチドを付加してもよい。例えば、Hisタグを付加した蛋白質を用いてもよい（実施例参照）。

具体的には、本発明においてICP47蛋白質およびUS6蛋白質には、それぞれ上記に示したICP47蛋白質（NP\_044675、P03170（配列番号:52）、またはNP\_044543など）およびUS6蛋白質（AAL67143（配列番号:54）、NP\_040091、またはNP\_612779など）と、アミノ酸配列において68%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む蛋白質が含まれる。アミノ酸配列の同一性は、本明細書に記載した方法に従って計算すればよい。例えばICP47蛋白質（NP\_044675、P03170（配列番号:52）、またはNP\_044543など）またはUS6蛋白質（AAL67143（配列番号:54）、NP\_040091、またはNP\_612779など）のアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算する。

また、本発明においてICP47蛋白質およびUS6蛋白質には、それぞれ上記に示したICP47蛋白質（NC\_001806の145311..145577、またはNC\_001798の147775..148035など）またはUS6蛋白質（AY072775、またはNC\_003521など）の蛋白質コード配列の30塩基以上、より好ましくは50塩基以上、より好ましくは100塩基以上、より好ましくは150塩基以上、より好ましくはコード配列全長と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸がコードする蛋白質が挙げられる。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、上記した通りである。

TAP阻害蛋白質を発現させるための発現ベクターは所望のベクターを用いることができるが、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが好ましい。ベクターは、TAP阻害剤の他に、後述のエピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta$ 2mを共発現するように構築することが可能である。

TAP活性の阻害は一過的であってもよいが、好ましくはエピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta$ 2mが発現するのに十分な期間（例えば3時間以上、好ましくは6、18、24、または30時間以上）、持続的に阻害する。例えば、エピトープ

を融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程において、外来エピトープが有意に提示されるのに十分な期間、TAP活性が阻害されていることが好ましい。

外来エピトープの提示を増強する本発明の方法においては、TAP活性を阻害する工程に加え酸処理を行う工程を含むことがより好ましい。酸処理を行う順序は制限されない。TAP活性を阻害する工程、またはエピトープ融合蛋白質を細胞で発現させる工程の前後または同時に行えばよい。例えば、発現ベクターを用いてTAP阻害因子とエピトープ融合蛋白質とを共発現させる場合に酸処理を行う方法の1つを具体的に挙げれば、(i) TAP阻害蛋白質、およびエピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ を細胞で発現させる工程に続き、(ii) 該細胞に酸処理を行う工程、を行う方法である。TAP活性を阻害する工程により、内因的な抗原プロセッシングの過程が遮断される一方、酸処理により既に細胞表面に提示されているエピトープペプチドを解離させることができる。酸処理とは、細胞表面に提示されているエピトープペプチドが有意に解離するような酸性環境に細胞を暴露することを言う。酸処理は、例えば細胞を4°Cの peptide stripping buffer (0.13 M citric acid (pH3), 66mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150mM NaCl, 17  $\mu\text{g/ml}$  Phenol Red) で1分間処理し、その後十分量の培養液 (例えばRPMI1640) にて中和することにより実施することができる。当業者であれば、これ以外にも同様の効果を示す酸処理を異なるプロトコルで行うことができる。

MHC class I 重鎖または $\beta 2m$ に結合させるエピトープは所望のものをを用いることができる。本発明において「エピトープ」とは、免疫細胞により認識され得るペプチドを言う。免疫細胞としては、T細胞、B細胞、NK細胞、またはNKT細胞などが挙げられる。本発明において好ましいエピトープは、T細胞により認識されるペプチドである。エピトープは、抗原提示細胞により提示されたペプチドのみならず、免疫細胞により認識され得る限り所望のペプチドであってよく、例えば、人工的に作製したアミノ酸配列からなるペプチドをエピトープとして用いることも

できる。より好ましくは、エピトープは抗原提示細胞（APC）により提示されたペプチドまたはその部分を含むペプチドである。本発明においてエピトープとなる蛋白質またはペプチドの「部分」は、通常、連続した8アミノ酸以上を含む部分である。好ましくは、連続した9アミノ酸以上、より好ましくは連続した10以上、12以上、または15以上のアミノ酸を含む部分である。また、本発明において細胞内で抗原プロセッシングを経て提示されているエピトープペプチドを、その細胞において内因的に提示されているエピトープと言い、それ以外のエピトープを「外来エピトープ」という。例えば、仮にアミノ酸配列が内因的に提示されたエピトープと同じであっても、細胞外から添加されたり、細胞内の抗原プロセッシングを経ないで提示されているエピトープは本発明において外来エピトープに含まれる。また、MHC class I重鎖または $\beta 2m$ などのMHCを構成する蛋白質に融合蛋白質の形態で共有結合しているエピトープペプチドなどは、本発明において外来エピトープに含まれる。TAP阻害剤を用いる本発明の方法により、細胞内の抗原プロセッシングを阻害し外来エピトープを高頻度で細胞に提示させることができる。

外来エピトープは、MHC class I 重鎖または $\beta 2m$ のどちらにでも結合させることができる。本発明において用いられるエピトープに制限はなく、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対して治療効果を有する所望のエピトープ等を用いることができる。エピトープは、一般的には8アミノ酸以上、例えば約10アミノ酸のペプチドを用いることが好ましいが、エピトープとするペプチドの長さは適宜変えることができる。 $\beta 2m$ に結合させる場合、エピトープは $\beta 2m$ の所望の部位に結合させてよいが、例えば分泌後の $\beta 2m$ 分子のN末端となるようにエピトープを結合させることが好ましい。このためには、 $\beta 2m$ の分泌シグナル配列に続いてエピトープを結合し、場合によりスペーサー配列を介して、 $\beta 2m$ 蛋白質を連結した融合蛋白質を製造すればよい。あるいは、スペーサーを介さず、エピトープを直接 $\beta 2m$ と連結してもよい。スペーサーのアミノ酸配列に特に制限はないが、例えば Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号：1）からなるアミノ酸配列またはその

繰返しである (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> 等を含むペプチドを用いることが好ましい。  
繰返し回数 (n) に制限はないが、例えば 1~5 (1、2、3、4、または 5) にすることができる。スペーサーを用いる場合、その長さは好ましくは16アミノ酸以内であり、例えば 4アミノ酸、8アミノ酸、または 16アミノ酸等を例示することができる。用いられる  $\beta 2m$  としては特に制限はなく、所望の哺乳動物の  $\beta 2m$  分子を用いることができる。ヒトへの適用のためにはヒト  $\beta 2m$  が好ましい。ヒト  $\beta 2m$  遺伝子は例えば実施例に記載したようにして単離することができる。なお  $\beta 2m$  は野生型蛋白質であってもよく、アミノ酸配列が改変された蛋白質であってもよい。

MHC class I 重鎖にエピトープを結合させる場合、エピトープはMHC class I重鎖の所望の部位に結合させてよいが、例えば分泌後のMHC class I分子のN末端となるようにエピトープを結合させるのが好ましい。このためには、MHC class I重鎖の分泌シグナル配列に続いてエピトープを結合し、場合によりスペーサーを介して、MHC class I重鎖を連結した融合蛋白質を製造すればよい。あるいはスペーサーを介さず、エピトープを直接MHC class I重鎖と連結してもよい。

スペーサーのアミノ酸配列に特に制限はないが、例えばGly-Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号：2) からなるアミノ酸配列またはそのくり返しである(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> 等を含むペプチドを用いることが好ましい。くり返し回数(n)には制限はないが、例えば1~5にすることができる。マウスMHC class I分子であるH2-K<sup>d</sup>を用いた報告では10アミノ酸GGPGGGSGGG (配列番号：3)、20アミノ酸GGP(GGGGS)<sub>2</sub>GGGSGGG (配列番号：4)、30アミノ酸 GGP(GGGGS)<sub>4</sub>GGGSGGG (配列番号：5) のスペーサー配列を比較した場合、10アミノ酸のスペーサー配列のものが最も効果的に認識されている (Mottez, E. et al., 1995, J. Exp. Med. 181:493-502) 。また、ヒトのMHC class IであるHLA-A2分子を用いた報告では10アミノ酸 (GGSGGGASGG) (配列番号：6) のスペーサー配列を用いて、メラノーマ抗原エピトープを効果的に提示させている (Kang, X. et al., 1997, Cancer Res. 57:202-205) 。従って、これらのスペーサー配列を介してエピトープを結合することは好ましい

。

MHC class I 重鎖としては、その由来に特に制限はないが、ヒトへの適用のためにはヒトのMHC class I分子 (HLA) が好ましい。ヒトのMHC class I分子はヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) と呼ばれ、非常に多様性に富んでいる。本発明において用いるHLAは、これらのいずれの分子でもよい。例えば感染症や癌などにおいて目的のエピトープが判明しているいずれのHLA型にも本発明を適用することが可能であり、オーダーメイド (あるいはテーラーメイド) な試薬または医薬とすることができる。

特に日本においては、HLA-A24(約6～7割)、HLA-A2(約4割)、及びHLA-A26(約2割)などのHLA型の頻度が高く、次いで、HLA-A11(2割)、-A31(2割弱)、-A33(2割弱)の頻度も高い。これらのHLAは、日本人への適用を考えた場合に特に好ましい。

ある程度の不特定多数に対応した試薬および医薬の開発のためには、例えば日本であれば、日本人において5%以上のアレル頻度のHLA (すなわち10%以上の日本人が有している) が好ましい。このようなHLA型としては以下のものが挙げられる。

A locus	B locus
A*0201	B*0702
A*0206	B*1501
A*1101	B*3501
A*2601	B*4001
A*31012	B*4002
A*3303	B*44031
	B*4601
	B*52011
	B*5401

実施例において本発明者らは、MHC class I分子としてA24拘束性HLA class I

重鎖を用い、エピトープとしては、A24拘束性HLA class I分子によって提示されるHIV-1由来のエピトープを用いた。HLA-A\*2402という遺伝子型は日本人の約6〜7割が持つ。従って、A24拘束性HLA class I 重鎖、特にA\*2402 (Litte, A.-M., Immunogenetics 35: 41-45 (1992)) は、日本人への適用を考えた場合に好適である。MHC class I 重鎖は野生型蛋白質であってもよく、アミノ酸配列が改変された蛋白質であってもよい。

エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ 、あるいはTAP阻害蛋白質は、公知の遺伝子組み換え技術により組み換え蛋白質として調製することができる (J. Sambrook and D. W. Russell eds., "Molecular cloning: a laboratory manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001)。組み換え蛋白質の発現に用いる発現ベクターに制限はなく、プラスミドベクターやウイルスベクターなど所望の発現系を用いればよい。組み換え蛋白質産生のための発現ベクター—宿主細胞系は様々なものが知られており、宿主細胞としては、例えばバクテリア、酵母、動物細胞、および植物細胞など所望の細胞を用いることができる。発現された組み換え蛋白質は、公知の蛋白質精製方法により実質的に純粋になるように精製することができる。本発明において好ましい態様においては、エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ は哺乳動物細胞において発現される。これにより、大腸菌などで発現させる場合に比べ、糖鎖などの修飾が正常に起こり、免疫細胞への抗原提示の効率が高まることが期待される。哺乳動物細胞で発現可能なベクターは、組み換え蛋白質の製造のためのみならず、ベクターを細胞に導入し、標的細胞の細胞表面に外来エピトープを提示させるために用いることもできる。哺乳動物細胞におけるエピトープ融合MHC class I 重鎖または $\beta 2m$ 、あるいはTAP阻害蛋白質の発現は、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターの導入により行うことが好適である。

エピトープ結合 $\beta 2m$ と膜結合型のMHC class I重鎖の両者の遺伝子を導入すれば、細胞表面上に特定のエピトープを提示する大量のMHC class I/ペプチド複合体

が発現される。この細胞は、エピトープ特異的CTLに対し、優れた抗原提示能を有している。

すなわち、本発明は以下を提供する。

[1] エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を製造する方法であって、

(a) 細胞のTAP活性を阻害する工程、および

(b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程、を含む方法。

[2] 酸処理を行う工程をさらに含む、[1] に記載の方法。

[3] 細胞のTAP活性を阻害する工程が、TAP阻害活性を有する蛋白質を該細胞に接触させる工程または、該蛋白質をコードするベクターを該細胞へ導入する工程である、[1] または [2] に記載の方法。

[4] TAP阻害活性を有する蛋白質がUS6またはICP47である、[3] に記載の方法。

[5] ベクターが哺乳動物細胞に感染可能なウイルスベクターである、[3] に記載の方法。

[6] ベクターがセンダイウイルスベクターである、[5] に記載の方法。

[7] [1] から [6] のいずれかに記載の方法により製造された、エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を含む組成物。

また本発明は、エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ を発現する哺乳動物細胞の製造方法に関する。この方法は、具体的には、(a) 哺乳動物細胞のTAP活性を阻害する工程、および (b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ をコードする遺伝子を該細胞で発現させる工程、を含む。工程 (a) および (b) の順序は限定されない。どちらを先に行ってもよく、また同時に行ってもよい。得られた細胞は、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために有

用である。例えば、患者由来の細胞（例えば樹状細胞）にこの方法を用いて目的の外来エピトープを高頻度に発現させ、患者体内において抗原特異的細胞性免疫を誘導することができる。特に、哺乳動物細胞のTAP活性を阻害する工程を、TAP阻害活性を有する蛋白質をコードするベクターを該細胞に導入する工程により実施することが好ましい。これにより、細胞でTAP阻害蛋白質が発現する。このとき、上記の工程（a）および（b）は同時に行う場合、例えばTAP阻害活性を有する蛋白質をコードするベクター、およびエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ をコードするベクターを細胞に共導入すること、また、TAP阻害活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を、エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ をコードするベクターに組み込み、同一ベクターから両者の蛋白質を共発現させることも本発明に含まれる。あるいは、TAP遺伝子を欠損させたり、TAP遺伝子の発現を抑制させた細胞に、工程（b）を行ってもよい。この細胞またはその培養上清から、産生されたエピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を回収することができる。TAP遺伝子を欠損した細胞は、例えば公知の遺伝子ターゲティング法に従って作り出すことができる。Cre-loxP系などを利用して、コンディショナルにTAP遺伝子の発現を制御することもできる。本発明は、TAP活性が阻害されており、かつエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞を提供する。また本発明は、TAP阻害剤を含むかまたはTAP阻害剤をコードする遺伝子を発現可能に保持し、かつエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞を提供する。細胞がある遺伝子を発現可能に保持するとは、該細胞においてその遺伝子が発現しているか、または薬剤等により発現を誘導することが可能であるように細胞に含まれていることを言う。例えば、誘導性プロモーターやCre-loxP系などを利用することにより、誘導的にその遺伝子を発現できる細胞などが挙げられる。

すなわち、本発明は以下を提供する。



〈1〉 (i) TAP活性が阻害されており、かつ (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞。

〈2〉 (i) TAP遺伝子の発現が阻害されているか、TAP阻害剤を含むか、またはTAP阻害剤をコードする遺伝子を発現可能に保持し、かつ (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞。

〈3〉 TAP阻害剤がUS6またはICP47である、〈2〉に記載の方法。

〈4〉 TAP阻害剤をコードする遺伝子、および/またはエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子が、哺乳動物細胞に感染可能なウイルスベクターを介して細胞に導入されている、〈1〉から〈3〉のいずれかに記載の方法。

〈5〉 ベクターがセンダイウイルスベクターである、〈4〉に記載の方法。

〈6〉 〈1〉から〈5〉のいずれかに記載の細胞を含む組成物。

哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いてTAP阻害蛋白質、および/またはエピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I 重鎖を発現させる場合、用いるベクターとしては特に制限はなく、所望のウイルスベクターを用いることができる。本発明において用いられる哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、哺乳動物細胞以外の細胞に感染する能力を有していてもよい。ベクターとしては、宿主に対する毒性が低く、導入遺伝子の高い発現が得られるものが好ましい。本発明において好適なウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、フォウルポックスウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが挙げられるがこれらに制限されない。これらのベクター系を用いて、TAP阻害因子、エピトープ結合MHC class I 重鎖または

$\beta 2m$ 、あるいはTAP阻害因子とエプトープ結合MHC class I 重鎖または $\beta 2m$ とを発現する組み換えウイルスベクター等を構築することができる。なお、本明細書において、「組み換え」ウイルスベクターとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルスベクターを言う。組み換えポリヌクレオチドとは、片端または両端が自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。より具体的には、例えば人為的にポリヌクレオチド鎖が繋ぎ替えられたり、あるいは新たに生成されたポリヌクレオチドである。「組み換え」ウイルスベクターは、例えば遺伝子操作により構築されたウイルスベクターまたはそれを増幅して得られるウイルスベクターが含まれる。組み換えウイルスベクターは、例えば、組み換えウイルスcDNAを宿主細胞で発現させ、ウイルス粒子を再構成して生成することができる。

組み換えウイルスベクターは当業者に周知の方法に従って調製することができる。例えば、遺伝子治療などに最も普通に利用されるアデノウイルスベクターの作製は、斎藤らの方法 (Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-24頁；鐘ヶ江ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社) に従い、例えばアデノウイルス (Ad) 5型ゲノムのほぼ全長からE1及びE3領域を除く31kbのAd DNAを持つ42KbのコスミドpAdex1cw (鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁) を、適当な制限酵素例えばSwaI等で切断し、ゲル濾過等にて適宜脱塩精製し、外来遺伝子発現ユニットをT4リガーゼ等による連結反応に供した後、酵素を熱失活し、ゲル濾過にて脱塩し、SwaIによる切断反応を行う。切断産物はフェノールによる酵素失活処理後脱塩し、再びSwaIで切断する。その一部についてギガパックXLキット (ストラタジーン社、米国) 等によるインビトロ・パッケージングを行い、連結産物を大腸菌に導入し得られたアンピシリン耐性形質転換株のいくつかについてコスミドを調製し、制限酵素消化によりその構造を調べ、外来遺伝子発現ユニットが目的の方向 (E1A、E1Bの転写と逆方向) に挿入された組換えコスミドを単離する。一方で、E1及びE3領

域を欠くアデノウイルス5型 (Ad5 d1X株) のDNA-末端蛋白質複合体 (DNA-TPC) を斎藤らの方法 (鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社) により調製する。これを例えば、制限酵素EcoT22Iで消化し、ついでゲル濾過等により脱塩精製する。該コスミドとEcoT22I消化断片を混合し、セルフエクトキット (ファルマシア社、スウェーデン) 等を用いて、293細胞に導入する。翌日、トランスフェクションした293細胞を懸濁し、その懸濁液、および10倍ないし100倍希釈液 (293細胞懸濁液にて希釈) を96穴プレートに撒く。約2週間後に、293細胞内での組換えによって生じた組換えアデノウイルスの増殖が見られたウェルから、死滅細胞を含む培養液を取り出す。それを数回凍結融解し、アデノウイルス粒子を細胞から放出させる。その遠心上清液 (1次ウイルス液) を、24穴プレートにまいた293細胞に感染させる。3日後に死細胞を含む培養液を取り出し、一部は1次ウイルス液作成の要領で凍結融解し、遠心上清液を得る (2次ウイルス液)。残りの培養液を遠心し、細胞を得る。それよりDNAを調製し、制限酵素切断によって組換えアデノウイルスDNAの構造を検討し、目的の構造が確認されたクローンを選択する。その2次ウイルス液を用いて、より多量の293細胞に感染させ、その培養液を同様に凍結融解、遠心し、3次ウイルス液を得る。3次ウイルス液について、斎藤らの方法 (鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社) により、力価を測定する。このようにして、組み換えアデノウイルスベクターを得ることができる (Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-1324頁; Kanegaeら、1996、Acta Paediatr. Jpn、38巻、182-188頁)。

他にも、例えばレトロウイルスベクター (脇本ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2508-2513頁)、アデノ随伴ウイルスベクター (玉寄ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2532-2538頁) などを用いることができる。これらは既に確立された方法で、効率的にベクターを生産出来ることが公知となっている。

哺乳動物に遺伝子導入可能なその他のベクターを製造するための詳細は、組換

エワクシニアウイルスを製造する方法としては、特表平6-502069、特公平6-95937、特公平6-71429が知られている。組換えパピローマウイルスを製造する方法としては特公平6-34727、特表平6-505626が知られている。組換えアデノ随伴ウイルスを製造する方法としては、特開平5-308975が知られている。組換えアデノウイルスを製造する方法としては、特表平6-508039が知られている。

本発明において特に好適な哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、パラミクソウイルスベクターである。「パラミクソウイルスベクター」とは、パラミクソウイルスに由来し遺伝子を宿主細胞に導入するベクター（担体）を指す。パラミクソウイルス科に属するセンダイウイルス（SeV）は最近、遺伝子導入ベクターとして開発が進められている（Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-598, 1997; 国際公開番号97/16538号および国際公開番号97/16539号）。SeVベクターは毒性が低く、導入した遺伝子から発現される蛋白質量が極めて高い。また、ベクター内の遺伝子が宿主染色体へ導入されることがないため、安全性にも優れている。SeVベクターのゲノムの安定性は高く、異種遺伝子発現の結果ではウイルスを連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている（Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466 (1997)）。また、カプシド構造タンパク質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性（flexibility）など性質上のメリットがある。複製能を有するSeVベクターは、外来DNAを少なくとも4 kbpまで導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事が可能である。SeVのレプリコンをベースにしたベクターは複製されたウイルスが周囲の細胞にも再感染し、感染細胞の細胞質で多コピーに複製されたRNPが細胞の分裂に伴い娘細胞にも分配されるため持続発現が期待される。また、SeVベクターは非常に広い組織適用範囲を持つ。

また、安全性の面においても、ヒトへの病原性が否定されているため、センダイウイルスベクターはヒトへの遺伝子治療の臨床試験に好適に用いられうること

が示唆される。第一に、プラスミドDNA等による導入遺伝子の発現は、多くの場合、導入したDNAの核局在化または核膜の消失が必要であることが、遺伝子発現の成功率を低下させる主要な障害になっている。しかし、例えばセンダイウイルスなどの場合、外来遺伝子の発現は、細胞質内において細胞性チューブリンおよび自身が持つRNAポリメラーゼ (L蛋白質) の両方によってウイルスの複製に伴って駆動される。これは、センダイウイルスが宿主の染色体と相互作用しないことを示しており、染色体異常による細胞の癌化および不死化などの安全面における問題が生じないと考えられる。第二に、センダイウイルスは齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、ヒトに対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている (Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。センダイウイルスのこれらの特徴は、センダイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用しうることを示唆し、センダイウイルスベクターが、インビボまたはエキシボでの遺伝子治療における有望な選択肢の一つとなることを支持するものである。

本発明において「パラミクソウイルス」とはパラミクソウイルス科に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明に用いられ得るパラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) のセンダイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンパーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1, 2, 3型等が挙げられる。本発明においてパラミクソウイルスは、好ましくはパラミクソ亜科 (レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む) に属するウイルス、より好ましくはレスピロウイルス属 (Respirovirus) (パラミクソウイルス属 (*Paramyxovir*

us) とも言う) に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明に用いられ得るレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型 (HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型 (HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型 (BPIV-3)、センダイウイルス (Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型 (SPIV-10) などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子 (J. Virol. 68, 8413-8417(1994)) 等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、ウイルスベクターを製造するための材料として使用することができる。

組み換えパラミクソウイルスベクターは、ウイルスゲノムをコードするDNAに適当な転写プロモーターを連結した組み換えDNAを構築し、これを試験管内または細胞内で転写させ、パラミクソウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下でRNPを再構成させ、このRNPを含むウイルス粒子を形成させることによりベクターを生成させることができる。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466; 国際公開97/16539号; 国際公開97/16538号; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 154

00-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含む所望のパラミクソウイルスベクターおよびその他の(-)鎖RNAウイルスベクターをDNAから再構成させることができる。パラミクソウイルスベクターは、通常、(a)パラミクソウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖(ポジティブ鎖)をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞(ヘルパー細胞)で転写させ、(b)該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収することにより調製することができる。ベクターDNAから転写されたRNAはNP、L、およびPタンパク質とRNP複合体を形成し、さらにエンベロープ蛋白質を含む外殻に包まれたウイルス粒子が形成する。

また本発明においてウイルスベクターには、ウイルス遺伝子を欠損したベクターも含まれる。例えばウイルスの複製に必須の遺伝子を欠損させた複製能欠損型ウイルスベクターなどであってもよい。パラミクソウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子および/またはHN遺伝子等を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、ウイルス産生細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。このような欠失型ウイルスベクターの製造方法も、公知の方法に従って、または順じて実施することができる(国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照)。ベクターからの外来遺伝子の発現量は、例えば、その遺伝子上流に付加する転写開始配列の種類により調節することができる(国際公開番号 W001/18223)。また、ウイルスベクターは、このウイルス以外に由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウイルスベクターであってもよい。このようなエンベロープ蛋白質には、VSV-Gなどが挙げられる(国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照)。

回収した動物細胞感染性ウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製する

ことができる。精製方法はフィルトレーション（濾過）、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウイルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質（但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く）のうち、ウイルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミクソウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができる。

TAP阻害蛋白質、およびエピトープ結合 $\beta$ 2mまたはMHC class I 重鎖を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、哺乳動物細胞に導入することにより、該細胞で高頻度に目的のエピトープを発現させることができる。本発明は、エピトープ結合 $\beta$ 2mまたはエピトープ結合MHC class I 重鎖の製造方法であって、(i)TAP阻害蛋白質、および(ii)エピトープ結合 $\beta$ 2m若しくはエピトープ結合MHC class I 重鎖、を発現可能にコードする（1つまたは複数の）哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程を含む方法を提供する。(i)および(ii)をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、別々のベクターである場合も、同一のベクターである場合も、本発明に含まれる。

また、本発明は、(i)TAP阻害蛋白質、および(ii)エピトープ結合 $\beta$ 2m若しくはエピトープ結合MHC class I 重鎖、を発現可能にコードする（1つまたは複数の）哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが導入された哺乳動物細胞を提供する。(i)および(ii)をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、別々のベク



ターである場合および同一のベクターである場合が本発明に含まれる。また本発明は、 $\beta 2m$ にエピトープを結合させた場合には、エピトープを結合していないMHC class I 重鎖を、また、MHC class I 重鎖にエピトープを結合させた場合には、エピトープを結合していない $\beta 2m$ を、発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターがさらに導入された上記哺乳動物細胞を提供する。このベクターは、TAP阻害蛋白質やエピトープ結合蛋白質をコードするベクターと同一のベクターでも別々のベクターでもよい。TAP阻害蛋白質としては、特にUS6およびICP47が挙げられる。また哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターとしては、特にパラミクソウイルスベクターが好ましい。

本発明の方法を用いて発現させたエピトープ結合 $\beta 2m$ は、インビトロにおけるCTLアッセイに利用することもできる。CTLアッセイの標的細胞としては、通常CTLと同一個体由来の細胞株、例えばエプシュタインバーウイルス(EBV)を用いてtransformしたB細胞株(auto-lymphoblastoid cell line, auto-LCL)を合成ペプチドでパルスしたものが用いられるが、合成ペプチドの代わりに本発明の方法により製造したエピトープ結合 $\beta 2m$ を添加したり、あるいは合成ペプチドの代わりに、例えばTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターをauto-LCLに感染させることによって標的細胞として使用することができる。またヒトの細胞株を使用する場合、例えばTAP阻害蛋白質を発現するベクター、および目的のMHC class I重鎖(膜結合型)を発現するウイルスベクターとそのMHC class I重鎖によって提示されるエピトープ結合 $\beta 2m$ とを発現するウイルスベクターを多重感染させることによって同様に標的細胞として使用することができる。

また、本発明の方法を用いて製造されたエピトープ結合 $\beta 2m$ はエピトープ特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の樹立に使用することができる。エピトープ特異的CTLは、試験管内で1回～数回特異的な刺激を加えることによって樹立できる。例えばHIV Nef138-10特異的CTLを樹立する場合、HIV-1感染者の末梢血単核球(PBMC)を、放射線照射によって増殖不能にしHIV Nef138-10ペプチドでパルスしたstimu

lator細胞（同一個体由来の細胞）で刺激を加え、IL-2存在下で共培養することによって可能となる。この時、通常合成ペプチドを使用するが、エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターを感染させた細胞の培養上清（すなわち遊離型エピトープ結合 $\beta 2m$ 蛋白質）でも同様の効果が見られる。また、stimulator細胞に例えばTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta 2m$ とを発現するウイルスベクターを感染させることによって同様にCTLを樹立できる。

本発明の方法により得られるエピトープ結合 $\beta 2m$ は、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用することができる。すなわち、本発明により得られるエピトープ結合 $\beta 2m$ は、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤となる。本発明により得られるエピトープ結合 $\beta 2m$ は、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用できる。

また、SeVの発現系にて発現したエピトープ結合 $\beta 2m$ は、これが分泌型蛋白質の形で細胞表面上のHLA-A\*2402分子と結合し、CTLに効率良く抗原を提示できる。本発明の方法を用いて製造されるエピトープ結合 $\beta 2m$ はタンパク製剤として利用することが可能であり、これを精製しウイルスの混入を除去すれば、臨床応用に有用な抗原特異的細胞性免疫誘導剤を得ることができる。本発明の方法を用いて産生されるエピトープ結合 $\beta 2m$ は医薬組成物として有用である。

例えば、エピトープ結合 $\beta 2m$ を用いて抗原特異的細胞性免疫を誘導する方法は、具体的には、エピトープ結合 $\beta 2m$ を（エピトープ特異的）CD8陽性T細胞に接触させる工程を含む方法により実施することができる。

例えば、インビトロでのエピトープ特異的CTL細胞株の樹立において、エピトープ結合 $\beta 2m$ は有用である。エピトープ特異的CTLは、試験管内で1回～数回特異的な刺激を加えることによって樹立できる。例えばHIV Nef138-10特異的CTLを樹立する場合、HIV-1感染者の末梢血単核球(PBMC)を、放射線照射によって増殖不能にし、HIV Nef138-10ペプチドでパルスしたstimulator細胞（同一個体由来の細胞）で刺激を加え、IL-2存在下で共培養することによって実施することができる。この時、通常合成ペプチドを使用するが、例えば本発明の方法で製造したエピトー

プ結合  $\beta 2m$  を添加しても同様の効果が得られる。

また、エピトープ結合  $\beta 2m$  は、インビトロでのCTLアッセイの標的細胞のパルスに有用である。CTLアッセイの標的細胞をパルスする際、合成ペプチドの代わりに本発明の方法で製造したエピトープ結合  $\beta 2m$  を添加しても同様の効果が得られる。通常は細胞表面上に、MHC class I重鎖（膜結合型）+  $\beta 2m$  + ペプチドが既に発現している。ペプチドのパルスは、ペプチド部分の入れ替えを狙ったやり方であるが、エピトープ結合  $\beta 2m$  を用いることにより、高い効率で  $\beta 2m$  + ペプチドとの入れ替えが行われるものと考えられる。既存のエピトープペプチドは、酸処理で除去することができる。

また、エキスビボで患者樹状細胞へパルスする際にもエピトープ結合  $\beta 2m$  は有用である。患者の末梢血単核球を採取し、スタンダードな方法で樹状細胞へと分化を誘導する。例えばエピトープ結合  $\beta 2m$  とTAP阻害蛋白質を発現するウイルスベクターを導入した樹状細胞を患者の皮下に接種する。インビトロの項と同様に、細胞表面でMHC class I重鎖+エピトープ結合  $\beta 2m$  の形で発現し、エピトープ特異的CTLを誘導できることが期待される。樹状細胞をペプチドでパルスした場合より、エピトープがMHC class I重鎖上に長期間、安定に、さらに高密度に発現する可能性があり、細胞性ワクチン（治療ワクチン）として期待できる。

エピトープ結合  $\beta 2m$  若しくはMHC class I重鎖を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、TAP阻害剤またはTAP阻害蛋白質を発現可能なベクターと組み合わせて抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用することができる。本発明は、(i) TAP阻害剤またはTAP阻害剤を発現可能にコードするベクター、および(ii) (a) エピトープ結合  $\beta 2m$  若しくはエピトープ結合MHC class I重鎖または(b) エピトープ結合  $\beta 2m$  若しくはエピトープ結合MHC class I重鎖を発現可能にコードするベクターを含む組成物に関する。ベクターは、適宜薬学的に許容される溶液中に懸濁させることができる。例えば、ベクターは生理食塩水、培養液、または血清中に含まれていてよい。該組成物は、MHC class Iによる外来エピト

ープの提示の増強剤として有用である。また該組成物は、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤として有用である。TAP阻害蛋白質をコードするベクターと、エピトープ結合 $\beta$ 2m若しくはMHC class I重鎖をコードするベクターは、別々のベクターであってもよく、あるいは同一ベクター内にコードされていてもよい。すなわち、TAP阻害剤を発現可能にコードするベクターとエピトープ結合 $\beta$ 2m若しくはMHC class I重鎖を発現可能にコードするベクターとが同一のベクターである場合も本発明に含まれる。また本発明は、(i)TAP阻害剤またはTAP阻害剤を発現可能にコードするベクター、および(ii)エピトープ結合 $\beta$ 2m若しくはMHC class I重鎖またはエピトープ結合 $\beta$ 2m若しくはMHC class I重鎖を発現可能にコードするベクターの、MHC class Iによる外来エピトープの提示を増強するための使用、および抗原特異的細胞性免疫を誘導するための使用に関する。このようなウイルスベクターは、遺伝子治療のために有用である。本発明は、(i)TAP阻害剤またはTAP阻害剤を発現可能にコードするベクター、および(ii)エピトープ結合 $\beta$ 2m若しくはMHC class I重鎖またはエピトープ結合 $\beta$ 2m若しくはMHC class I重鎖を発現可能にコードするベクターを含む医薬組成物を提供する。また、本発明は(i)TAP阻害剤または該阻害剤を発現可能なベクター、および(ii)エピトープを融合させたMHC class I重鎖若しくは $\beta$ 2m、または該MHC class I重鎖若しくは $\beta$ 2mを発現可能なベクター、を含むエピトープを提示させるためのキットに関する。(i)と(ii)が分離可能である場合は、それらは分離されていてもよく、または混ぜ合わされていてもよい。キットには、複数種のTAP阻害剤または該阻害剤を発現可能なベクターが含まれていてもよく、また複数種のMHC class I重鎖若しくは $\beta$ 2m、または該MHC class I重鎖若しくは $\beta$ 2mを発現可能なベクターが含まれていてもよい。これらは適宜、薬学的に許容される溶液に溶解または懸濁されていてよい。ベクターとしては、特に動物細胞感染性ウイルスベクターが好ましい。ベクターを含む本発明の組成物およびキットは、抗原特異的細胞性免疫を誘導できるため、感染症や癌などにおいて抗原特異的免疫を誘導するために有用である。本発明の組成物または

キットの遺伝子治療への応用としては、直接（インビボ）投与による遺伝子発現、間接（エキスビボ）投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても投与することができる。

例えば、インビトロでのエピトープ特異的CTL細胞株の樹立において、stimulator細胞での刺激において合成ペプチドを使用する代わりに上記組成物またはキットを適用することによってCTLを樹立できる。

また、インビトロでCTLアッセイの標的細胞のパルスにおいて使用することもできる。合成ペプチドの代わりに例えばTAP阻害下でエピトープ結合 $\beta$ 2m発現ウイルスベクターをauto-LCLに感染させることによって標的細胞として使用することができ、細胞傷害活性を検出することができる。またヒトの細胞株を使用する場合、目的のMHC class I重鎖（膜結合型）を発現するウイルスベクターと、そのMHC class I重鎖によって提示されるエピトープ結合 $\beta$ 2mおよびTAP阻害蛋白質を発現するウイルスベクターとを重感染させることによって同様に標的細胞として使用することができる。

さらに本発明の組成物およびキットは、エキスビボで患者樹状細胞でのエピトープ発現にも有用である。患者の末梢血単核球を採取し、スタンダードな方法で樹状細胞へと分化を誘導する。この樹状細胞に本発明の組成物を投与してその細胞を患者の皮下に接種する。特にウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行うことが好ましい。ペプチドやエピトープ結合 $\beta$ 2m蛋白などでパルスしても、樹状細胞上でどれくらいの期間持続発現されるかが問題となりうる。実際にペプチドパルスでは、樹状細胞上でのエピトープは発現が短期間で消失することが指摘されている。その点ウイルスベクターを感染させ、細胞内からエピトープ結合 $\beta$ 2mを発現させれば、長期にわたってエピトープ結合 $\beta$ 2mを発現させることができる。さらに、インビボでの投与によりエピトープ特異的CTLを誘導するインビボ遺伝子治療にも本発明の組成物およびキットは有用である。

外来エピトープを発現させるための遺伝子導入の標的となる細胞は、好ましく

は抗原提示能を有する細胞である。このような細胞としては、特に樹状細胞（DC）が挙げられる。例えば、エキスピボにおいて、樹状細胞に、本発明の方法を用いて外来エピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖を発現するベクターを導入することによって、該細胞において所望のMHC class I/ペプチド複合体を高頻度で形成させることができる。この細胞を用いて、抗原特異的T細胞を活性化することができる。エピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖をコードする遺伝子が外来的に導入され、かつTAP活性が阻害された哺乳動物細胞は本発明に含まれる。哺乳動物細胞としては、抗原提示能を有する所望の単離細胞等を用いることができる。特に、該細胞において、MHC class I/ペプチド複合体のうちエピトープを結合させていないサブユニットをコードする遺伝子も外来的に導入することにより、大量のMHC class I/ペプチド複合体を形成させることができる。これらの導入遺伝子は染色体外に存在する発現ベクターにコードされていてもよく、また細胞の染色体に組み込まれていてもよい。膜結合型MHC class I重鎖を発現させれば、該細胞表面に膜結合型MHC class I/ペプチド複合体が発現する。この細胞は、エピトープ特異的CTLに対して優れた抗原提示能を有する。上記のエピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはエピトープ結合MHC class I重鎖をコードする遺伝子が外来的に導入され、かつTAP活性が阻害された哺乳動物細胞は、医薬組成物の成分としても有用である。

本発明における組成物は、必要に応じて薬理学的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせられてよい。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、細胞に投与することが可能であり、有効成分の活性を有意に阻害しない材料である。例えば本発明において組成物は、生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などを含み得る。鶏卵で増殖させたパラミクソウイルスベクターを含む組成物等においては尿液を含んでもよい。また細胞を含む組成物は生理食塩水、PBS、または培養液などに懸濁してもよい。また本発明の組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでもよい。さらに、その他にも、

植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。本発明の組成物は試薬として、および医薬として有用である。また本発明の組成物はワクチンとして有用である。本発明は、本発明における組成物の試薬、医薬、またはワクチンとしての使用にも関する。ワクチン組成物は、免疫原性を高めるために、サイトカイン、コレラ毒素、サルモネラ毒素等の免疫促進剤を添加することもできる。またワクチンには、ミョウバン、不完全Freund'sアジュバント、MF59（オイルエマルジョン）、MTP-PE（マイコバクテリア細胞壁由来の muramyl tripeptide）、および QS-21（soapbark tree *Quilaja saponaria* 由来）などのアジュバントを組み合わせることもできる。

また、本発明の医薬組成物の投与に際しては、アジュバント効果を高めるサイトカイン類を組み合わせることも有効である。このような遺伝子としては、例えば i) IL-2と一本鎖IL-12 との組み合わせ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (15): 8591-8596, 1999）、ii) IL-2とインターフェロン- $\gamma$ （米国特許第 5,798,100号）、iii) 単独で用いられる顆粒球コロニー刺激因子（GM-CSF）、iv) 脳腫瘍を治療対象とした GM-CSF と IL-4 の組み合わせ（J. Neurosurgery 90 (6), 1115-1124 (1999)）などが挙げられる。

ワクチンとして用いる場合、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対して適用することができる。感染症の治療としては、例えば感染性微生物の抗原蛋白のエピトープを解析し、これを結合させた  $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖を製造することができる。抗原蛋白としては、例えばインフルエンザにおいては、強毒株H5N1型等のエンベロープ、日本脳炎においては、例えばエンベロープ蛋白質（Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882 (1999)）、エイズにおいては、例えばHIV gagまたは SIV gag 蛋白質（J. Immunology (2000) vol. 164, 4968-4978）、HIVエンベロープ蛋白質、Nef蛋白質、その他のウイルス蛋白質などが挙げられる。コレラにおいては、例えばコレラ毒素のBサブユニット（CTB）（Ara

kawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(10): 934-8、Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(3): 292-7)、狂犬病においては、例えば狂犬病ウイルスの糖タンパク (Lodmell DL et al., 1998, Nature Medicine 4(8): 949-52)、子宮頸癌においては、ヒトパピローマウイルス6型のカプシドタンパクL1 (J. Med. Virol, 60, 200-204 (2000)) などが挙げられる。また、病原性のパラミクソウイルス、例えば、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルスのようなワクチンの必要性の高いウイルスに本発明を適用することもできる。また、日本脳炎のJE-E抗原タンパク質 (特開昭64-74982、特開平1-285498)、ヒト単純ヘルペスウイルスの gD2タンパク質 (特開平5-252965)、C型肝炎ウイルス由来ポリペプチド (特開平5-192160)、偽狂犬病ウイルス由来ポリペプチド (特表平7-502173) などにおけるエピトープを用いることもできる。例えば、これらの病原性微生物に感染した患者由来の細胞を解析して、抗原提示細胞 (APC) において提示された抗原蛋白のエピトープを同定する。HLA型を適宜選択することにより、所望のHLA型に対するエピトープを同定することが可能である。

腫瘍特異的抗原に着目し、それらを標的とした多角的な新しい治療戦略や治療法の開発を行うことには腫瘍治療の上で臨床的意義がある。例えば腫瘍治療としては、腫瘍細胞、またはDC細胞などの抗原提示細胞 (APC) にエピトープ結合  $\beta 2m$  若しくはMHC class I重鎖を発現させたり、エピトープ結合  $\beta 2m$  またはMHC class I/ペプチド複合体等の蛋白質製剤を投与することができる。

一般的な手法としては、ヘルパーT細胞 (Th) への抗原提示能を持つことが知られている樹状細胞 (DC) が、CTLに対してもMHCクラスI分子を介して高い抗原提示能を有することが知られており、これを用いたワクチン療法の開発が挙げられる (J. I. Mayordomo et al., Nature Med. 1(12), 1279-1302, (1995))。腫瘍免疫療法の一例としては、種々の悪性腫瘍にも発現が認められるMAGE抗原を標的とした腫瘍ワクチン療法の確立が藤也寸志ら (国立病院九州がんセンター) により進められている。再発胃腫瘍症例6例、再発食道腫瘍1例の7例に対し治療を施行した



ところ、食道腫瘍症例で転移リンパ節の縮小、腫瘍マーカーの減少および臨床症状(嗔声)の改善が認められ、胃腫瘍症例では6例中4例で腫瘍マーカーの減少を認めている。副作用は全く認められておらず、腫瘍免疫療法の安全性が示唆されている。また臨床症状の改善や腫瘍マーカーの低下が見られた症例が多く、ワクチンの投与法や適応症例の選別などにより有効な治療法となりうる可能性を示唆している。MAGE-3ペプチドを用いたDCワクチン療法は、実際に臨床試験が開始され、進行再発消化器癌症例に対する安全な腫瘍特異的免疫療法となる可能性が示唆される。しかしながら多数の患者を対象とした予防的ワクチン投与においては、“nature adjuvant”である樹状細胞を各々の患者に対して最適に調整、投与していくのは明らかに煩雑で、非現実的である。何らかの効率的方法が求められている(『山岸 久一ら京都府立医科大学 日本癌治療学会総会1999年10月12日(火) 於岐阜市での発表』)。このような腫瘍ワクチン療法に本発明を適用することは極めて有効であると考えられる。

ウイルスが引き金となってできる腫瘍の予防は、そのウイルスのワクチンによる感染予防により達成されうる。ウイルスが原因の腫瘍は他の原因による腫瘍に比較し、確実に予防が可能となる。例えば、肝臓腫瘍に関わるC型肝炎ウイルス(HCV)、子宮がんに関わるパピローマウイルス(HPV)、成人性白血病の原因であるHTLV-1につき、感染予防と治療を目的としたワクチンがあげられる。肝臓腫瘍は日本の腫瘍発症の中でも高い割合を占める。C型肝炎ウイルスは非経口的に感染し、免疫能が正常の成人であっても高率に慢性化する。感染者の約20%は慢性肝炎、肝硬変を発症するものと考えられる。更に、肝硬変患者の多くで肝細胞癌が発症する。C型肝炎に対する治療はインターフェロンの登場により患者の一部で治癒に導くことが可能となったが、有効率は当初期待されたほどではなく、半数以上の患者に対して、いまだに有効な治療法がない現状である。一般のウイルス感染の予防は、ワクチン接種により中和抗体を誘導して行うがC型肝炎ウイルスは変異しやすく、現在の所、感染を終息させる中和抗体の存在は証明されていない。ウイルス

感染症では中和抗体の誘導以外にCTLを誘導することにより、感染予防が可能であることが知られている。本発明により、このようなケースに対してもCTL活性化を誘導できると期待される。

森山貴志(自治医科大学)らは、CTLを誘導する新しい方法として病原体抗原をコードする遺伝子そのものをワクチンとして用いる方法(DNAワクチン)を研究している。その問題点は概説書が示すとおり、発現量が十分でない、投与部位が筋肉などに限られる等がある(『DNAワクチン その現状と新知見; 倉根一郎(感染症研); 今日の感染症; Vol. 19, NO. 3 PAGE. 6-9, 2000』)。また『癌と免疫 癌の特異的免疫療法 HER2由来ペプチドによる乳癌のワクチン療法; 影山慎一, 渡辺正人, 日浅厚則, 珠玖洋(三重大 医); 現代医療; Vol. 32, NO. 5 PAGE. 1167-1172 2000』では乳癌などで過剰発現が認められているチロシンキナーゼ活性を持つ膜型糖蛋白質HER2を利用した癌ワクチンについて概説されている。例えば、本発明に従いウイルスベクターを利用して癌ワクチンを製造すれば、このようなDNAワクチンよりも高い効果を発揮することが期待される。哺乳動物の広範な組織で発現可能なウイルスベクター(アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクターなど)を用いてベクターを構築すれば、高い効果を有するワクチンを提供することが可能と考えられる。

子宮がんは女性のための腫瘍であるが、HPVによる感染予防と治療ワクチンの開発の重要性は変わらない。HTLV-1は、母子感染が主な感染ルートと理解されるに至ったが、それ以外の感染経路もある。近年発見されたHGVは病原性は明確になっていないが、HCVと共に社会に拡がっており、このようなウイルスの防疫も公衆衛生上必要であり、本発明の適用の対象となる。

抗原提示細胞の利用並びに投与経路に関する検討も重要である。最も研究されている投与経路は、樹状細胞(DC)がCTLに対してもMHC class I分子を介する抗

原提示能を有することを利用して、末梢血に存在する単球 (monocyte) を用いて試験管内でDCに分化させ、これを静脈内注射で体内にもどす方法を用いたワクチン療法である。この方法は相当の施設と、培養時間を必要とする方法である。最近注目される方法は皮膚を利用したワクチン療法である。ランゲルハンス細胞 (LC) を含む樹状細胞は、近年その細胞上のMHC class I分子を介してウイルス抗原や癌抗原などの内在性の抗原を効率的にCTLに提示することが判明し、この細胞を用いた抗ウイルスワクチン法や癌ワクチン治療法の研究が大きく注目されている。皮膚の表皮には多数のLCが常在しているので、皮膚へのウイルスペプチドまたは癌ペプチド、さらには抗原含有遺伝子の塗布により効果的なDNAワクチン法が開発できる可能性がある。しかしながら正常皮膚でLCは休止状態にありThやCTLへの抗原提示能は低く、リンパ節内への移動性にも富まないため正常皮膚を用いてのウイルスワクチン法や癌ワクチン治療法は実現が難しい。これを解決する方法として、瀬尾尚弘、瀧川雅浩 (浜松医科大学) らは皮膚最外層の角質層バリアをテープストリッピング (TS) を8~15回繰り返すことによって破壊し、その皮膚でLCが活性化し、リンパ節内へ移動し効率的にTh細胞に抗原提示することを実証した (特願平10-316585 Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Vol. 97, Issue 1, 371-376, January 4, 2000)。このような方法はバリア破壊皮膚へのウイルスペプチド、癌ペプチドさらには抗原DNAの適用においてウイルスワクチンまたは癌治療の可能を広げるものである。本発明においても、これらの投与方法を適用することができる。

さらに確実な臨床応用のためには、ヒトHLA拘束性癌特異的CTL株を作製し、その認識する癌反応性CTL誘導抗原遺伝子をクローニングし、癌患者に対して臨床応用可能な腫瘍特異的免疫療法の標的分子を開発することが重要である。対象とする患者と同じ型を持つHLAにより提示されたエピトープを同定し、これを用いてワクチンベクターやペプチドワクチンを製造することにより、より効果的に免疫を

誘導することが期待できる。

日本において多発する癌、例えば肺癌、消化管癌(食道、胃、大腸癌)、肝癌、頭頸部癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、腎癌及び白血病のなかでも、組織型としてはそれらの大部分を占める扁平上皮癌及び腺癌を治療ターゲットする事は臨床上有益である。上皮性癌は日本における成人悪性腫瘍の大半を占めるのみならず、世界にも最も頻発する癌である。よって、上皮性癌細胞特異的抗原のエピトープは、本発明において好適に用いられる。またHLAとしては日本でも発現頻度の高いHLA-A24(癌患者の約6割)、HLA-A2(約4割)、及びHLA-A26(約2割)抗原拘束性のCTL認識性癌退縮抗原の同定が特に重要である。次いで、HLA-A11(2割)、-A31(2割弱)、-A33(2割弱)を対象とする同定も重要である。日本人の95%以上は少なくともHLA-A24、-A2、-A26、-A31、-A33のいずれか一方を保有する。また上記HLAアレルは人種をこえて広く認められる。したがってこれらのタイプのHLAを持つ細胞から癌反応性CTL誘導抗原遺伝子を同定し、これを本発明に適用することが好ましい。

伊東恭悟(久留米大 医)らは日本人に多発するヒトHLA-クラス・拘束性上皮癌(腺癌及び扁平上皮癌)に対する特異的キラーT細胞を多数樹立し、それらの認識する上皮癌反応性CTL誘導能をもつ抗原遺伝子をすでにクローニングしている。さらに同遺伝子によりコードされる癌抗原ペプチドを同定し、同ペプチドによるインビトロにおけるキラーT細胞誘導能の解析が行われている(食道癌患者自己CTL癌局注による特異的養子免疫療法後の末梢血リンパ球に対するクローニングとその解析: 唐宇飛, 山名秀明, 末吉晋, 新谷文彦, 田中寿明, 久保田雅博, 峯孝志, 笹原弘子, 伊東恭悟(久留米大); 日本消化器外科学会雑誌; Vol. 33, No. 7, Page 1191, 2000)。これまでのところ扁平上皮癌cDNAライブラリーより4種類の遺伝子(SART-1~SART-4)、腺癌cDNAライブラリーより3種類の遺伝子がクローニングされ、それらをコードする蛋白が解析されている。SART-1遺伝子導入した癌細胞は選択的アポトーシスを誘導した。またHLA-A24拘束性ペプチド(SART-1 690-698)が強いCTL誘導およびHLA-A26拘束性ペプチドSART-1 736-744によるHLA-A2601

、-A2602、-A2603癌患者CTL誘導が確認されている（『腫瘍の抗原ペプチド療法 SART-1抗原ペプチドを用いた癌ワクチン療法；山名秀明，伊東恭悟（久留米大 医）；医学のあゆみ；Vol. 190, NO. 2 PAGE. 129 - 133 1999』、『SART1ペプチドによるサブタイプの異なるHLA-A26陽性健康人及び癌患者末梢血リンパ球からのCTLの誘導；井上佳子（国立腫瘍セ 研）；中尾真修，松永和子，増岡・菊地慈，山名秀明，伊東 恭悟（久留米大 医）；日本癌学会総会記事』）。さらにSART-3癌反応性CTL誘導抗原遺伝子：140 kDのSART-3抗原が増殖細胞に選択的に発現し、かつ癌細胞に限って核内にも発現し、同抗原内にHLA-A24+癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有する2つの9個のアミノ酸からなるペプチド（nonapeptide）が同定されている（『転移性癌患者におけるHLA-A24拘束性1ck由来ペプチドを用いた細胞傷害性T細胞の誘導と機能解析；山名秀明，笹富輝男，宮城佳昭，唐宇飛，白水雄，伊東恭悟（久留米大 医）；日本外科学会雑誌；Vol. 101, 臨時増刊号 PAGE. 417 2000』）。これらの癌反応性CTL誘導抗原の各種癌における蛋白レベルでの発現はSART-1抗原は扁平上皮癌の60～80%、乳癌を除く腺癌の40～50%に発現していた。またSART-2は扁平上皮癌の60%以上に、SART-3は腺癌、扁平上皮癌を含む大部分の悪性腫瘍で発現していた。これに対し、これらの抗原は正常組織には睾丸を除き発現されていない（腫瘍免疫 9 ヒト癌特異的キラーT細胞により認識される抗原 2へん扁平上皮癌反応性CTL誘導抗原SART-1およびペプチドワクチン；伊東恭悟，七条茂樹，山名秀明（久留米大 医）；免疫 Immunology Frontier；Vol. 9, No. 3, Page 195-204, 1999）。HLA-A26は日本人の22%、HLA-A\*2402は日本人の約60%が保有している。これらより、日本における多くの上皮性癌患者に対してこれらのペプチドワクチンは応用可能と考えられている。現在久留米大学において上記ペプチドを用いての第1相臨床試験が計画されている（臨床ガイドライン解説 第1回腫瘍ペプチドワクチン臨床試験のガイドラインについての提案；山名秀明，伊東恭悟（久留米大 医）；分子細胞治療；Vol. 1, No. 1, Page 89-95, 2000）。これらの抗原蛋白質に由来するエピトープに本発明を適用することは有効で

あると考えられる。

以上に記載したペプチド抗原をコードする遺伝子を本発明に用いれば、腫瘍および病原性感染微生物等に対する有効な免疫治療を行うことが可能となる。その他のエピトープとしては、癌抗原 Muc-1 または Muc-1様ムチンタンデムリピートペプチド（米国特許第 5,744,144号）、メラノーマ gp100抗原などが挙げられる。これらの遺伝子による治療は、乳癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌等、幅広い応用が示されている。また、上記に示した腫瘍抗原ペプチドHER2遺伝子の正常組織および腫瘍での発現は、乳癌、卵巣癌、胃癌、非小細胞性肺癌において約20から40%の症例に遺伝子増幅または発現の増加が認められ、その発現増加は腫瘍特異性の傾向が高いと考えてよい。卵巣癌患者および健常人末梢血由来単核球より精製した樹状細胞とHER2由来の2種の9merペプチド（HER2p63-71、p780-788）なども例示することができる（Eur. J. Immunol. 2000, 30: 3338-3346）。また、CEA陽性進行固形癌に対して、CEAエピトープペプチドを用いた癌ワクチン療法（特異能動免疫療法）に本発明の医薬組成物等を適用することも考えられる（Kim, C. et al., Cancer Immunol. Immunother. 47 (1998) 90-96）。例えば、成分採血により患者より多量の末梢血単核細胞を採取した後、その単球分画からIL-4、GM-CSF添加下に樹状細胞(DC)を誘導、誘導されたDCに本発明の方法を用いて製造したCEAペプチドのエピトープを含む $\beta$ 2mあるいはベクターを導入し、“DCワクチン”として皮内投与することが考えられる（CEA特異的能動免疫療法により血清CEA値と抗腫瘍効果に解離を認めた肺癌 骨転移の一例；清水啓二，上田祐二，伊藤剛，岡本和真，白数積雄，阪倉長平，大辻英吾，北村和也，山岸久一（京都府医大）；日本臨床外科学会雑誌）。

また、一般病への適用も考えられる。糖尿病においては、例えばI型糖尿病モデル動物において、インシュリン断片のペプチドをエピトープとして利用することが考えられる（Coon, B. et al., J. Clin. Invest., 1999, 104(2):189-94）。

本発明の組成物をワクチンとして用いる場合、抗原特異的細胞性免疫を少なく

とも部分的に誘導するのに十分な量を投与される。但し、投与蛋白質量、または導入遺伝子の発現量は、その有効レベルおよび中毒レベルを考慮して決められるべきである。投与経路は適宜選択することができるが、例えば経皮的、鼻腔内の、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、関節内、または皮下等に行われうるがそれらに限定されない。また局所あるいは全身に投与し得る。細胞性免疫の誘導は、本発明に記載したようなCTLアッセイ等により検出することができる。

ベクターを含む組成物の投与により細胞に導入された遺伝子の発現量は、当業者に公知の方法によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNAプロテクションアッセイ等により検出・定量することができる。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等による検出は *in situ* でも行い得る。また、翻訳産物を検出するには、抗体を用いたウェスタンブロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。また、導入遺伝子発現の検出を容易にするため、発現させる蛋白質にタグを付加したり、レポーター遺伝子を発現するようにベクター中に組み込んでおくことも可能である。レポーター遺伝子は、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、CAT、アルカリホスファターゼ、またはGFPをコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに制限されない。

エピトープ結合  $\beta 2m$  またはMHC class I/ペプチド複合体などの蛋白質組成物の投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。例えば、蛋白質質量として、10ng/kgから100  $\mu$ g/kg、好ましくは100ng/kgから50  $\mu$ g/kg、より好ましくは1  $\mu$ g/kgから5  $\mu$ g/kgの範囲であるとよい。複数のエピトープを組み合わせて投与する場合には、それぞれを上記の量で投与するとよい。エピトープ結合  $\beta 2m$  またはMHC class I/ペプチド複合体などの蛋白質組成物は、適宜、薬学上容認可能な担体を含んでよい。

ベクター組成物の投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的

、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。パラミクソウイルスベクターであれば、投与されるベクターの濃度は好ましくは約 $10^5$  pfu/mlから約 $10^{11}$  pfu/ml、より好ましくは約 $10^7$  pfu/mlから約 $10^9$  pfu/ml、最も好ましくは約 $1 \times 10^8$  pfu/mlから約 $5 \times 10^8$  pfu/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。投与量は、好ましくは約 $10^5$  pfu/回から $10^{11}$  pfu/回、より好ましくは約 $10^7$  pfu/回から $10^9$  pfu/回、最も好ましくは約 $10^8$  pfu/回から $10^9$  pfu/回で投与する。複数のベクターを組み合わせて投与する場合には、それぞれを上記の量で投与するとよい。

本発明の組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、エピトープ結合 $\beta 2m$  (e/ $\beta 2m$ ) を発現するSeVベクター製造用プラスミド (e/ $\beta 2m$ /pSeVb) の構造を示す図である。(A) は、pSeV18b(+)のNotI部位にe/ $\beta 2m$ コード配列が挿入されたe/ $\beta 2m$ /pSeVbの構造を示す。(B) はベクターがコードする $\beta 2$ ミクログロブリンおよびエピトープ結合 $\beta 2$ ミクログロブリンの構造、(C) は挿入したNotI断片の配列を示す。

図2は、膜結合型HLA A\*2402 を発現するSeVベクター製造用プラスミド (A24full/pSeVb) の構造を示す図である。(A) は、pSeV18b(+)のNotI部位にA24fullのコード配列が挿入されたA24full/pSeVbの構造を示す。(B) は挿入したNotI断片の配列を示す。

図3は、TAP阻害因子を発現するSeVベクター製造用プラスミドの構造を示す図である。(A) は、pSeV18c(+)のNotI部位 (N遺伝子とP遺伝子の間) にICP47 $his$ またはUS6 $his$ A24fullのコード配列が挿入された、それぞれICP47 $his$ /pSeVcおよびUS6 $his$ /pSeVcの構造の構造を示す。(B) は挿入したNotI断片の配列を示す。

図4は、エピトープ結合 $\beta 2m$  (e/ $\beta 2m$ ) およびTAP阻害蛋白質 (ICP47 $his$ または



US6his) を共発現するSeVベクターの構造を示す図である。e/β2m/pSeVbとICP47his/pSeVcから<e/β2m+ICP47his>/pSeVを、e/β2m/pSeVbとUS6his/pSeVcから<e/β2m+US6his>/pSeVを構築した。

図5は、膜発現型MHC class I/ペプチド複合体の効果を示す図である。H9細胞 (HLA-A\*2402- ヒトT細胞株) にA24full/SeVbおよびe/Nef138-β2m/SeVbをそれぞれm. o. i. =10および2で感染した (図中 "A24full+e/Nef138-β2m")。陰性コントロールとしてe/Nef138-β2m/SeVbの代わりにwt/SeVを感染したものを用いた (図中 "A24full+wt")。また比較としてペプチドをパルスする実験も行った (図中 "A24full+wt ペプチドパルス (10 μl)")。18時間後100 μCiのNa<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>で2時間ラベルしNef138-10特異的CTLクローンを用いて<sup>51</sup>Cr放出アッセイを行った。(A) はアッセイの手順を、(B) はその結果を示す。

図6は、分泌型エピトープ結合β2mの効果を示す図である。H9細胞 (HLA-A\*2402- ヒトT細胞株) にe/Nef138-β2m/SeVbまたは対照群としてwt/SeVをm. o. i. =2で重感染させ、3日後に培養上清を回収し0.22 μmのフィルターを用いて濾過した。

標的細胞としてH9細胞 (HLA-A\*2402- ヒトT細胞株) にA24full/SeVbおよびwt/SeVをそれぞれm. o. i. =10および2で重感染した。SeV感染後、18時間経過した標的細胞を100 μCiのNa<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>で2時間ラベルした。その後、上記のように調製したe/Nef138-β2mを含む培養上清 (黒四角)、もしくは陽性コントロールとして10 μM Nef138-10合成ペプチド (黒菱形)、陰性コントロールとしてwt/SeV感染細胞培養上清 (白丸) をパルスした。1時間後、Nef138-10特異的CTLクローンを用いて<sup>51</sup>Cr放出アッセイを行った。比較としてA24full/SeVbおよびe/Nef138-β2m/SeVbをそれぞれm. o. i. =10および2で重感染したH9細胞も同様にアッセイした (黒丸)。(A) はアッセイの手順を、(B) はその結果を示す。

図7は、TAP阻害蛋白質を発現するSeVベクターの導入による細胞表面上のMHC class I/ペプチド複合体の減少を示す図である。ICP47his/SeVcまたはUS6his/SeVcをH9細胞にm. o. i. 3で感染させ、18, 24, 30, 42時間後に細胞を回収し、抗MHC c

lass I抗体にて染色し、細胞表面のMHC class I/ペプチド複合体の発現量をフローサイトメトリーにて解析した (A)。パネル(B)中の数値はM.F.I. (Mean Fluorescent Intensity、平均蛍光強度)を表す。また、点線はアイソタイプコントロール、実線は野生型SeVを感染させたものを表す (以下図8、9、11も同じ)。TAP阻害蛋白質の発現により、新規のMHC class I/ペプチド複合体の膜表面の発現が阻害され、時間の経過とともにMHC class I/ペプチド複合体が減少した。しかしながら既存のMHC class I/ペプチド複合体には影響をおよぼさないで、減少のレベルは少ない。

図8は、既存のMHC class I/ペプチド複合体への酸処理の効果を示す図である。MT-2細胞を酸処理の後、1, 3, 6 時間後に抗MHC class I抗体にて染色し、細胞表面のMHC class I/ペプチド複合体の発現量をフローサイトメトリーにて解析した (A)。酸処理により細胞膜表面のMHC class I/ペプチド複合体上のペプチドが剥がれ、細胞表面上のMHC class I/ペプチド複合体は減少した (B)。その後6時間程度ではほぼ酸処理前と同程度まで細胞膜上のMHC class I/ペプチド複合体の発現量が回復した。

図9は、酸処理およびTAP阻害蛋白質を発現するSeVベクターの導入によるMHC class I/ペプチド複合体の発現の抑制効果を示す図である。MT-2細胞にICP47 $his$ /SeVcまたはUS6 $his$ /SeVcをm. o. i. 3で感染させ、14時間後に酸処理を行い、その6時間後に抗HLA-A24抗体にて染色し、細胞膜表面のMHC class I/ペプチド複合体の発現量をフローサイトメトリーにて解析した (A)。酸処理により既存のMHC class I/ペプチド複合体が除去され、さらにTAP阻害蛋白質によって新規のMHC class I/ペプチド複合体の細胞表面への発現が抑制された結果、酸処理から6時間後も細胞表面のMHC class I/ペプチド複合体の発現量は低いままであった (B)。

図10は、エピトープ結合 $\beta$ 2mおよびTAP阻害蛋白質を共発現するSeVベクターの細胞への導入、細胞内での両蛋白質の発現を示す写真である。(A)は抗(His)<sub>6</sub>抗体、(B)は抗 $\beta$ 2m抗体を用いた。〈e/Nef138- $\beta$ 2m+US6 $his$ 〉/SeV感染細胞において

e/Nef138- $\beta$ 2mおよびUS6hisが発現していることが示されている。レーンM: サイズマーカー、レーン1: <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his>/SeV、レーン2: US6his/SeVc、レーン3: e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb、レーン4: e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVc、レーン5: wt (野生型) SeV。

図11は、エピトープ結合 $\beta$ 2mおよびTAP阻害蛋白質を共発現するSeVベクターの導入によるエピトープ結合 $\beta$ 2mを結合したMHC class I/ペプチド複合体の発現を示した図である。(A)はアッセイの手順、(B)はその結果を示す。ICP47hisまたはUS6hisのみを発現するSeVベクター (それぞれ<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47his>/SeVまたは<e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his>/SeV) を用いて導入した細胞では酸処理の6時間後も細胞表面上のMHC class I/ペプチド複合体は減少したままであるが、e/Nef138- $\beta$ 2mとICP47hisまたはUS6hisとを共発現するSeVベクターを導入した細胞では酸処理の6時間後に酸処理前のレベルまで細胞表面上のMHC class I/ペプチド複合体の発現量が回復していることを示している。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

##### [実施例1] HLA-A\*2402遺伝子およびヒト $\beta$ 2m遺伝子の単離

ヒトのMHC class Iの1つである HLA-A\*2402遺伝子、およびヒト $\beta$ 2m遺伝子は、HLA-A24 を持つ健常人末梢血単核球 (PBMC) 由来のメッセンジャーRNA (mRNA) よりクローニングした。mRNAの分離には Micro-FastTrack Kit (Invitrogen) を用いた。cDNA 合成には AMV-RT First-strand cDNA synthesis kit (LIFE SCIENCE) を用いた。

得られたcDNA を鋳型にしてHLA-A\*2402遺伝子はプライマー HLA-5P2, HLA-3Bを用いて、 $\beta$ 2m遺伝子は b2m-5', b2m-3' を用いてPCRにより増幅した。

HLA-5P2, 5'-GGGCGGATCCGGACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG-3' (配列番号: 7)

HLA-3B, 5'-CCGCCTCGAGCTGGGGAGGAAACAGGTCAGCATGGGAAC-3' (配列番号: 8)

b2m-5', 5'-GGCACGAGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGC-3' (配列番号: 9)

b2m-3', 5'-AATTGGAATTCATCCAATCCAAATGCCGC-3' (配列番号: 10)

PCR は94°C30秒、58°C30秒、72°C1分、35サイクルの後、72°C 7分で伸長反応を行った。PCRは Ex Taq (Takara) を用いて行った。得られたPCR産物はpGEM-T vector system (Promega) を用いてクローニングし (それぞれA\*2402/pGEMおよびβ2m/pGEMとした)、塩基配列をシーケンス反応にて確認した。シーケンス反応は dye terminator chemistry (Big-Dye terminator cycle sequencing Ready Reaction kit; Applied Biosystems) を用い、ABI-377 DNA Sequencer にて電気泳動を行った。

#### [実施例2] エピトープ結合β2m発現ベクターの作製

以下のようにして、エピトープ結合β2mを発現するSeVベクターをコードするプラスミド(e/β2m/pSeVb)を構築した。β2mのシグナル配列の下流への各エピトープ、リンカーの挿入、センダイウイルスのE, Sシグナル、NotI部位の付加はPCR法によって行った(図1)。リンカーのアミノ酸配列は、GGGS (配列番号: 1) が3回繰り返した配列 (GGSGGGSGGGS/配列番号: 11) となるようにした。

使用したプライマー;

e/b2m-a1, 5'-GGAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGGTTCTGGTGGAGGTTTCGATCCAGCGTACTCCAAAGATT-3' (配列番号: 12)

e(Nef)-a2, 5'-TCTGGCCTGGAGGCTAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTTCGGAGGAGGTGGCGGGTCC-3' (配列番号: 13)

e(Env)-a2, 5'-TCTGGCCTGGAGGCTAGATACCTAAGGGATCAACAGCTCCTAGGGATTGGAGGTGGCGGGTCC-3' (配列番号: 14)

e/b2m-a3, 5'-TGCGGCCGCCGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCT-3' (配列番号: 15)

b2m-d, 5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTACCCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTTACATGT  
CTCGATCCCACTT-3' (配列番号：16)

$\beta$  2m/pGEMを鋳型に e/b2m-a1, b2m-d を用いて 94°C 1分、48°C 1分、72°C 1分、にて15サイクル行った後、72°C 7分にて伸長反応を行った。得られたPCR 産物を鋳型としてe(Nef)-a2, あるいは e(Env)-a2 と b2m-d とを用いて同条件にて PCR を、さらにその PCR 産物を鋳型として e/b2m-a3 と b2m-d とを用いて同条件にて PCR を行い、それぞれe/Nef138- $\beta$  2m, e/Env584- $\beta$  2m 断片を得た。e/Nef138- $\beta$  2m, e/Env584- $\beta$  2m断片を、それぞれ pGEM-T vetor system (Promega) を用いてクローニングし、塩基配列をシーケンス反応にて確認した。塩基配列確認後NotIにて消化し、pSeV18\*b(+)のNotI切断部位に挿入し、再度塩基配列を確認し e/Nef138- $\beta$  2m/pSeVb, e/Env584- $\beta$  2m/pSeVb を得た (「e/ $\beta$  2m/pSeVb」と総称する)。また、本来の $\beta$  2mのみを発現するセンダイウイルス  $\beta$  2m/pSeVb は b2m-a (5'-TGCGGCCGCCGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3' /配列番号：17)とb2m-d とを用いて上記と同様に  $\beta$  2m/pSeVb を得た。Nefのエピトープ (Nef138-10) のアミノ酸配列を配列番号：21に、Envのエピトープ (Env584-11) のアミノ酸配列を配列番号：23に示す。

### [実施例3] 膜結合型MHC class I重鎖発現ベクターの作製

センダイウイルス E, S シグナル、NotI部位の付加は PCR にて行った (図2)

使用したプライマー;

A24-a#, 5'-TGCGGCCGCCGTACGCCGAGGATGGCCGTCATGGCGCCCCG-3' (配列番号：28)

A24-d4, 5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTACCCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTCACACTT  
TACAAGCTGTGAG-3' (配列番号：29)

A\*2402/pGEM を鋳型として A24-a#, A24-d4 を用い94°C 1分、48°C 1分、72°C 1分、にて15サイクル行った後、72°C 7分にて伸長反応を行い、A24full 断片を得

た。以下e/ $\beta$ 2m/pSeVb 作製時と同様に A24full/pSeVb を得た。

〔実施例4〕 ICP47発現ベクターおよびICP47/エピトープ共発現ベクターの作製  
単純ヘルペス1型ウイルス (HSV-1) 由来の ICP47 (US12) 遺伝子がクローニングされているUS12/pGEX-5X-2 は 文献「McGeoch, D. J., Nucleic Acids Res. 14(4):1727-1745 (1986)」に記載されている。ICP47遺伝子断片へのヒスチデントグ (his), センダイウイルスのE, Sシグナル、NotI部位の付加は PCRにて行った (図3)。

使用したプライマー;

ICP-Esn, 5'-TGCGGCCGCGAGTAAGAAAACTTAGGGTCAAACGTACGGCCGAGATGTCGTGGGCCCCT  
GGAAAT-3' (配列番号: 34)

ICPhis-R, 5'-TTGCGGCCGCTATCAATGGTGGTGATGGTGGTGAGCTCCACGGGTACCGGATTAC-  
3' (配列番号: 35)

US12/pGEX-5X-2 を鋳型として用い94°C 1分48°C 1分、72°C 1分、にて15サイクル行った後、72°C 7分にて伸長反応を行い、ICP47his断片を得た。以下、e/ $\beta$ 2m/pSeV 作製時と同様にこの断片を pSeV18<sup>+</sup>c(+) (Kato, A. et al., J. Virol. 73(11):9237-9246 (1999)) に導入して ICP47his/pSeVc を得た。

e/Nef138- $\beta$ 2m/pSeVb と ICP47his/pSeVc をKpnI, SpnI (New England BioLab) で消化し、e/Nef138- $\beta$ 2m/pSeVb のe/Nef138- $\beta$ 2m を含む断片 (4kb) とICP47his/pSeVc の ICP47his を含む断片 (15kb) を Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いてライゲーションを行い、<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47his>/pSeV を得た (図4)。

〔実施例5〕 US6発現ベクターおよびUS6/エピトープ共発現ベクターの作製

ヒトサイトメガロウイルス (CMV) AD169 株ウイルス液は文献「Chen, Z. et al., Virology 258(2):240-248 (1999)」に記載されている。CMV AD169 株ウイルス液からのDNA抽出液を鋳型としてPCR 反応を行った (図3)。

使用したプライマー;

US6-a, 5'-TGCGGCCGCCACTCCTTCACTATGGATCTCTTG-3' (配列番号: 36)

US6his-d1, 5'-CTACGGCGTACGTCAATGGTGGTGATGGTGGTGAGCTCCGGAGCCACAACGTCTGAAT-  
3' (配列番号: 37)

US6his-d2, 5'-TTGCGCCGCGATGAAC TTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTCA-3' (配列番号: 38)

US6-a, US6his-d1 を用い94℃, 1分、48℃, 1分、72℃, 1分、にて15サイクル行った後、72℃, 7分にて伸長反応を行い、US6his断片を得た。以下e/β2m/pSeVb作製時と同様に US6his/pSeVc を得た。

$\langle e/\text{Nef138-}\beta 2\text{m+ICP47his} \rangle/\text{pSeV}$  と同様に  $e/\text{Nef138-}\beta 2\text{m/pSeVb}$  と  $\text{US6his/pSeVc}$  の組み換えによって  $\langle e/\text{Nef138-}\beta 2\text{m+US6his} \rangle/\text{pSeV}$  を得た (図 4)。

## 〔実施例 6〕 センダイウイルスベクターの再構成および感染

pSeV18<sup>b</sup>(+), pGEM-L, pGEM-P, pGEM-N, vTF7-3 は Hasan, M. K. et al., J. G. en. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466 に記載されている。センダイウイルスベクターの再構成は、上記文献に記載の方法に従って行った。e/Nef138-β2m/pSeVbおよびe/Env584-β2m/pSeVbから、それぞれセンダイウイルスベクターe/Nef138-β2m/SeVbおよびe/Env584-β2m/SeVbを得た（e/β2m/SeVbと総称する）。またA24full/pSeVbからセンダイウイルスベクターA24full/SeVbを得た。

ICP47 $his$ /pSeVおよび<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47 $his$ >/pSeVから、それぞれセンダイウイルスベクターICP47 $his$ /SeVおよび<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47 $his$ >/SeVを得た。また、US6 $his$ /pSeVおよび<e/Nef138- $\beta$ 2m+US6 $his$ >/pSeV から、それぞれセンダイウイルスベクターUS6 $his$ /SeVおよび<e/Nef138- $\beta$ 2m+US6 $his$ >/SeVを得た。

サルの腎臓由来細胞株 CV-1 および LLCMK2 は、10% ウシ胎児血清 (FCS)、10 OU/ml ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリン (Life Technologies) を含む MEM (SIGMA) 培地 (M10) にて培養した。以下のセンダイウイルスの感染においては、特に断らない限り、それぞれ記載された m. o. i. にて組換えセンダイウイルスを CV-1細胞に感染させ、無血清MEMにて三日間培養した。

[実施例7] エピトープ結合  $\beta 2m$  (e/ $\beta 2m$ ) の回収および定量

e/ $\beta 2m$ /SeVbまたは  $\beta 2m$ /SeVb (エピトープなし) を感染させた CV-1 細胞の培養上清を、センドイウイルス粒子を除去するため、 $40,000\times g$  で遠心し上清を回収した。

培養上清中のe/ $\beta 2m$ の定量はサンドウィッチ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて行った。Capture 抗体には抗ヒト  $\beta 2$ ミクログロブリンモノクローナル抗体 (DACO)  $2.5\mu g/ml$  を、detector 抗体には抗ヒト  $\beta 2$ ミクログロブリンモノクローナル抗体パーオキシダーゼ標識 (DAKO)  $500ng/ml$  を用い、発色には TMB パーオキシダーゼ発色キット (BIO-RAD) を用いた。

標準サンプルに精製ヒト  $\beta 2$ ミクログロブリン (Biogenesis) を用いた。

[実施例8] Nef138-10 特異的CTLクローンの樹立

HLA-A\*2402 を持つ HIV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) を  $3\times 10^5/96well$  ずつ R10  $100\mu l$ で一晩培養した。次の日に stimulator細胞 ( $0.2\mu g/ml$  PHA (SIGMA)、10% Lymphocult-T (Biotest) を含むRPMI1640 (SIGMA) 培地 (R10)で一晩活性化し $3,000 rad$ にて放射線照射を行った後、 $10\mu M$  のNef138-10 で1時間パルスした自己の PHA-blast) を加え、抗ヒト CD28  $1\mu g/ml$  存在下で2週間培養した。その後1週間おきにstimulator細胞 ( $10,000 rad$  で放射線照射し  $10\mu M$  Nef138-10 でパルスした自己の Epstein-Barr virus transformed B細胞株(B-LCL)) で刺激を加えた。2~4回刺激後、CTL活性が確認できたらクローニングを行った。

クローニングは $0.8 cell/well$  の細胞を  $1\times 10^5 cell/well$  stimulator細胞( $10,000 rad$  の放射線照射後、 $10\mu M$  Nef138-10 でパルスをした 自己の B-LCL)、 $5\times 10^4 cell/well$  feeder細胞 ( $3,000 rad$  で放射線照射した健常人 PBMC) とともに 10% Lymphocult-T, 2.5% PHA-sup (健常人 PBMC ( $3\times 10^6/ml$ ) を  $0.2\mu g/ml$  PHA で 48 時間刺激した培養上清) 存在下で3~4週間培養した。

[実施例9] 膜結合型MHC class I/ペプチド複合体を形成するSeV導入細胞のCTLによる認識



CTL  $^{51}\text{Cr}$  放出アッセイを以下のようにして行った。ヒトCD4<sup>+</sup>Tリンパ球株 H9を10% FCS、100U/ml ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリン を含むRPMI1640 (SIGMA) 培地 (R10) にて培養した。2×10<sup>3</sup>cell/well の標的細胞 (ヒトT細胞株 H9) を 100  $\mu\text{Ci}$  Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> で2時間ラベルし、R10 にて3回洗った後、10  $\mu\text{M}$  のペプチド (Nef138-10) で1時間パルスした。SeVベクター導入細胞を標的細胞とする場合は、ラベルの17 時間前 (すなわち、エフェクター細胞を添加する20時間前) に図5に示す組み合わせでSeVベクターの感染をm. o. i. =10:2で行った。各 E:T 比 (エフェクター細胞 : 標的細胞比) にしたがって実施例8の細胞をエフェクター細胞として加え4時間 37°Cでインキュベートし、その上清中の  $^{51}\text{Cr}$  を $\gamma$  カウンターで測定した。自然放出 (Spontaneous release) の測定にはエフェクター細胞の代わりに R10 を、最大放出 (Maximum release) の測定にはエフェクター細胞の代わりに 4% TritonX-100/PBS を入れた。

特異的リシス (Specific Lysis) (%) は [各サンプルのcpm - 自然放出 (Spontaneous release) のcpm] / [最大放出 (Maximum release) のcpm - 自然放出 (Spontaneous release) のcpm] ×100 で計算した。

膜結合型MHC class I/ペプチド複合体のCTLによる認識を調べた結果を図5に示した。A24full/SeVb と e/Nef138- $\beta$  2m/SeVb を共導入した細胞において、抗原特異的CTL活性化を検出できることが判明した。

#### [実施例10] SeV導入細胞から回収したエピトープ結合 $\beta$ 2mの効果

SeV導入細胞で産生されたエピトープ結合  $\beta$  2mを調製するため、e/Nef138- $\beta$  2m/SeVbをH9細胞にm. o. i. =2で導入し、3日後に培養上清を回収し濾過してエピトープ結合  $\beta$  2mを含む溶液を得た。A24full/SeVbを感染させたH9を標的細胞として実施例9と同様のCTLアッセイを行い、ペプチドでのパルスと上記で得たエピトープ結合  $\beta$  2mを含む溶液でのパルスを比較した。

エピトープ結合  $\beta$  2mの効果を図6に示した。SeV導入細胞から回収したエピトープ結合  $\beta$  2mを標的細胞の培養液に添加することによって、抗原特異的CTL活性を検

出できることが判明した。

[実施例 1 1] ICP47, US6による細胞表面MHC class I/ペプチド複合体のdownregulation

ヒトCD4<sup>+</sup> Tリンパ球株H9、MT-2、マウスのハイブリドーマA11.1M (Foung, S. K. H., et al., 1986, Human Immunol. 15:316-319) は10% FCS、100U/ml ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリンを含むRPMI1640 (SIGMA) 培地 (R10) にて培養した。HIV-1 感染者から誘導した CTL line、CTL clone は 10% Lymphocult-T (Biotest) を含むR10にて培養した。

ヒトCD4<sup>+</sup> Tリンパ球株 H9 にICP47<sup>his</sup>/pSeVc, US6<sup>his</sup>/pSeVc をm.o.i. 3 にて感染させ、18、24、30、42 時間後に抗MHC class I モノクローナル抗体 3F10 FITC 標識 (Ancell) で細胞表面を染色し、フローサイトメトリーにて解析した。100倍希釈した抗MHC class I抗体、3F10-FITCと4℃、20分間反応させた後、3回洗浄し1% パラホルムアルデヒドを含むPBS (Phosphate Buffered Saline) にて固定した。染色および洗浄には2% ウシ胎児血清、0.1% アジ化ナトリウムを含むPBSを用いた。フローサイトメトリーは FACS Caliber (Beckton Dickinson) にて行い、解析にはFlowJo Ver. 3.3 (Treestar) を用いた。

対照として用いた野生型SeVを感染させた細胞では、MHC class I/ペプチド複合体の発現量に有意な変化は検出されなかったが、ICP47<sup>his</sup>/SeVcおよびUS6<sup>his</sup>/SeVcを感染させた細胞では時間の経過とともにMHC class I/ペプチド複合体が減少し、新規の MHC class I/ペプチド複合体の膜表面の発現が抑制されていることが示唆された (図7)。しかしながら既存のMHC class I/ペプチド複合体が存在しているため、劇的には減少していない。

[実施例 1 2] 既存のMHC class I/ペプチド複合体への酸処理の効果

TAPの阻害により新規のMHC class I/ペプチド複合体の発現を抑制できることが示されたことから、次に既存のMHC class I/ペプチド複合体を酸処理により除去する処理による効果を確認した。

酸処理によるペプチドの解離は、MT-2細胞（HLA-A24+）を4℃のpeptide stripping buffer (0.13M citric acid (pH3), 66mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 17 μg/ml Phenol Red) 200 μlで1分間処理し、その後 12mlのRPMI1640 にて中和することにより行った。処理直後（0時間）、1、3、6時間後に抗HLA-A24抗体産生ハイブリドーマ、A11.1Mの培養上清、抗マウスIgG抗体FITC標識（Imunotech）で染色し、上記と同様にフローサイトメトリーにて解析した（図8）。

酸（pH 3）で細胞を処理することにより、膜表面 MHC Class I/ペプチド複合体上のペプチドが剥がれ、細胞表面上の MHC class I/ペプチド複合体が減少することが示された。また、6時間後には元のレベルまで回復することが示された。

【実施例 1 3】 酸処理およびTAP阻害蛋白質発現ベクターによる細胞表面 MHC class I/ペプチド複合体の減少

酸処理が既存のMHC class I/ペプチド複合体を減少させることがわかったので、TAP阻害蛋白質発現ベクター感染後TAP阻害蛋白質が十分量発現した後（14時間後）、酸処理を施し既存のMHC class I/ペプチド複合体を除去し、さらに6時間後に細胞膜表面のMHC class I/ペプチド複合体を解析することによって、TAP阻害蛋白質による新規のMHC class I/ペプチド複合体の細胞膜表面の発現抑制の効果を調べた。

MT-2細胞にICP47<sub>his</sub>/SeVcまたはUS6<sub>his</sub>/SeVをm. o. i. 3にて感染させ、14時間後に実施例 1 2と同様に酸処理を行い、その6時間後に実施例 1 2と同様にMHC class I/ペプチド複合体（A11.1M）で細胞表面を染色し、フローサイトメトリーにて解析した（図9）。ICP47、US6ともに新規のMHC class I/ペプチド複合体の細胞表面への発現を効果的に抑制していることが示された。また、その抑制効果はほぼ同程度であることが確認された。

【実施例 1 4】 TAP阻害蛋白質とエピトープ結合 β 2m共発現ベクターによるTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 β 2mの同時発現

実施例 5 で作製したTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 β 2mを共に発現するベクタ

一が実際に両蛋白質を発現しているかをウエスタンブロットにて解析した。

CV-1細胞にe/Nef138- $\beta$ 2m、US6his を各々発現するSeV、および共発現するSeV、野生型SeVを m. o. i. 3 にて感染させ、その24時間後に感染細胞を回収した。回収した感染細胞をTNE Buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.8), 1% NP40, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 10  $\mu$ g/ml aprotinin)にて溶解し、その可溶画分にSDS-PAGEを行い、さらに抗(His)<sub>6</sub>抗体、抗 $\beta$ 2m抗体にてウエスタンブロッティングを行い、US6his、e/Nef138- $\beta$ 2mの蛋白発現を確認した(図10)。PVDF膜にブロッティングした後、ブロックエース(大日本製薬)にてブロッキング後1000倍希釈した抗(His)<sub>6</sub>抗体 Penta-His Antibody (QIAGEN)、または抗 $\beta$ 2m抗体 (Immunotech) と4°C、1時間反応させた。4回洗浄後2000倍希釈した抗マウスIgG 抗体HRP標識 (Roche) と室温1時間反応させ、4回洗浄後Lumi-Light plus substrate (Roche)を用いて発色させた。検出はLumi Imager F1 (Boehringer Mannheim)を用いて行った。洗浄にはTBS-T (20mM Tris-HCl (pH7.5)、500mM NaCl, 0.05% Tween-20)を用い、抗体の希釈には10倍希釈したブロックエースを用いた。〈e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his〉/SeV感染細胞においてUS6his、e/Nef138- $\beta$ 2mの発現が確認された。US6hisの発現量もUS6his/SeVcとほぼ同程度であることが確認された。

〔実施例15〕 TAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta$ 2m共発現ベクターによる酸処理後のMHC class I/ペプチド複合体の回復

実施例13、14より酸処理を施したTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta$ 2m共発現ベクター感染細胞では内在性蛋白質由来のエピトープを提示したMHC class I/ペプチド複合体の細胞膜表面の発現が抑制され、TAPを介したペプチドの輸送を必要としないエピトープ結合 $\beta$ 2mと結合しているMHC class I/ペプチド複合体が高密度に発現していると考えられる。

MT-2細胞にICP47his/SeVcまたはUS6his/SeV、〈e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47his〉/SeVまたは〈e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his〉/SeVをm. o. i. 3にて感染させ、14時間後に実施例13と同様に酸処理を行い、その6時間後に実施例13と同様にMHC class I/ペプ

チド複合体 (A11. 1M) で細胞表面を染色し、フローサイトメトリーにて解析した (図 1 1) 。 ICP47 $his$ /SeVc, US6 $his$ /SeVc感染細胞ではともに細胞膜表面のMHC class I/ペプチド複合体の発現が抑制されているが、 $\langle e/Nef138-\beta 2m+ICP47his \rangle/SeV$ 、 $\langle e/Nef138-\beta 2m+US6his \rangle/SeV$ 感染細胞では野生株SeV感染細胞とほぼ同レベルまでMHC class I/ペプチド複合体が回復している。これは、TAP阻害蛋白質とエピトープ結合  $\beta 2m$ 共発現ベクター感染細胞ではエピトープ結合  $\beta 2m$ を結合しているMHC class I/ペプチド複合体が非常に高密度に発現していることを示している。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、哺乳動物細胞においてエピトープ結合MHC class Iまたは  $\beta 2m$ を発現させる場合に、内因性のエピトープの提示を抑制することによって目的の外来エピトープを効率的に提示させることが可能となった。これによりある特定の (単一の) エピトープを提示するMHC class I/ペプチド複合体を細胞表面に高密度に発現することが可能となる。インビボおよびエクシボでエピトープ結合MHC class Iまたは  $\beta 2m$ を発現させるベクターを導入する際に本発明の方法を適用すれば、目的の抗原に対して特異的な細胞性免疫を効果的に誘導することが可能である。本発明は、感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法などにおける遺伝子治療等に有用である。

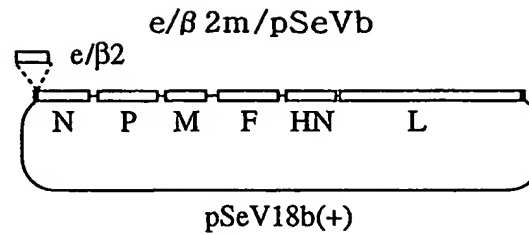
## 請求の範囲

1. MHC class Iによる外来エピトープの提示を増強する方法であって、
  - (a) 細胞のTAP活性を阻害する工程、および
  - (b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程、を含む方法。
2. 酸処理を行う工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
3. 細胞のTAP活性を阻害する工程が、TAP阻害活性を有する蛋白質を該細胞に接触させる工程または、該蛋白質をコードするベクターを該細胞へ導入する工程である、請求項1または2に記載の方法。
4. TAP阻害活性を有する蛋白質がUS6またはICP47である、請求項3に記載の方法。
5. ベクターが哺乳動物細胞に感染可能なウイルスベクターである、請求項3に記載の方法。
6. ベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項5に記載の方法。
7. (i) TAP遺伝子の発現が阻害されているか、TAP阻害剤を含むか、またはTAP阻害剤をコードする遺伝子を発現可能に保持し、かつ (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞。
8. (i) TAP阻害剤または該阻害剤を発現可能なベクター、および (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ 、またはエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を発現可能なベクター、を含むエピトープを提示させるためのキット。
9. 下記 (i) および (ii) の両方を発現可能なベクター；
  - (i) TAP阻害剤、および
  - (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させ

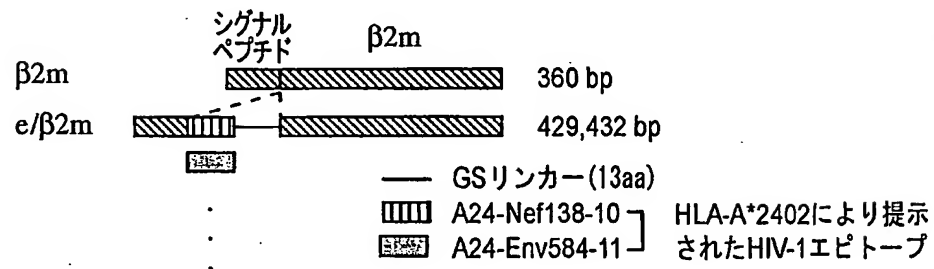
た  $\beta$  2m。

図 1

(A)



(B)



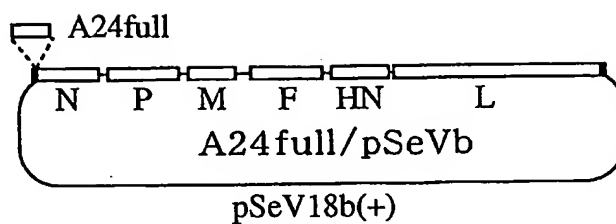
(C)

< Not I >	<..... β2mシグナル .....
CGGGCCCGCTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCT	
M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A	(配列番号:18)
	(配列番号:19)
<..... HIV-A24Nef138-10 .....	
AGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTTC GGA	(配列番号:20)
R Y P L T F G W C F G	(配列番号:21)
<..... HIV-A24Env584-11 .....	
AGATACCTAAGGGATCAACAGCTCCTAGGGATT	(配列番号:22)
R Y L R D Q Q L L G I	(配列番号:23)
<..... リンカー .....	<..... β2m .....
GGAGGTGGCGGTCCGAGGTGGTTCTGGTGGAGGTTTCGATCCAGCGTACTCCAAAGATT	(配列番号:24)
G G G G S G G G S G G G S I Q R T P K I	(配列番号:25)
(途中略)	
<..... β2m .....	<シグナル> <シグナル> < Not I >
AAGTGGGATCGAGACATGTAACGTACGCCGTAGTAAGAAAACTTAGGGTGAAGTTCATCGCGCCGC	(配列番号:26)
K W D R D M *	(配列番号:27)



図 2

(A)



(B)

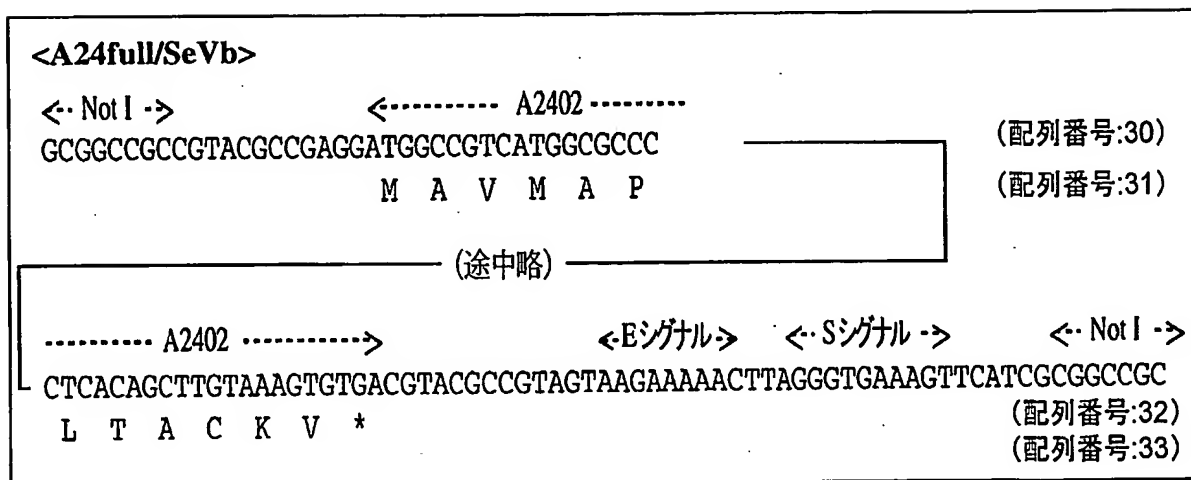
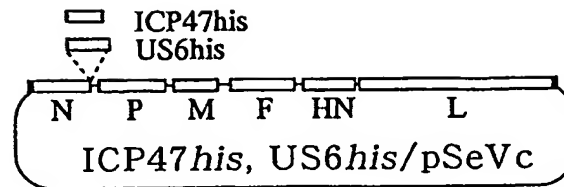


図 3

(A)



(B)

pSeV18c(+)

## &lt;ICP47 his/pSeVc&gt;

<-. Not I -> <Eシグナル> <Sシグナル> <..... ICP47 .....>  
 GCGGCCGCAGTAAGAAAACTTAGGGTCAAACGTACGGCCGAGATGTCGTGGGCCCTGGAA (配列番号:39)  
 M S W A L E (配列番号:40)  
 (途中略)  
 ..... ICP47 .....> <..... (His)<sub>6</sub>.....> <-. Not I ->  
 CGTAATCCGGTAACCCGTGGAGCTCACCACCATCACCACCATTGATAGCGGCCGC (配列番号:41)  
 R N P V T R G A H H H H H H \* (配列番号:42)

## &lt;US6 his/pSeVc&gt;

<-. Not I -> <Eシグナル> <Sシグナル> <..... US6 .....>  
 GCGGCCGCAGTAAGAAAACTTAGGGTCAAAGCCTTCACTATGGATCTCTTGATTCGT (配列番号:43)  
 M D L L I R (配列番号:44)  
 (途中略)  
 ..... US6 .....> <..... (His)<sub>6</sub>.....> <-. Not I ->  
 ATTCGACGTTGTGGCTCCGGAGCTCACCACCATCACCACCATTGATAGCGGCCGC (配列番号:45)  
 I R R C G S G A H H H H H H \* (配列番号:46)

図 4

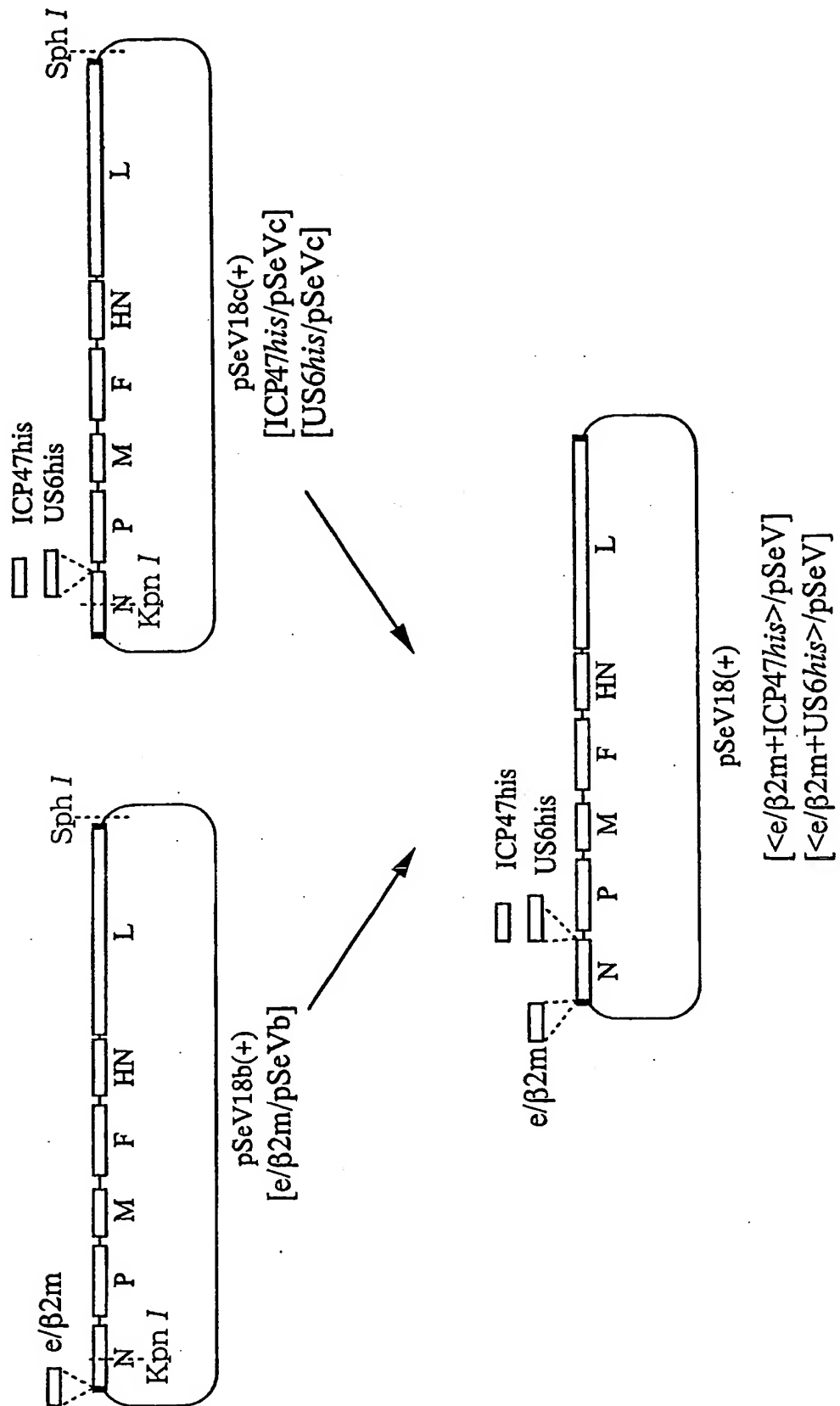
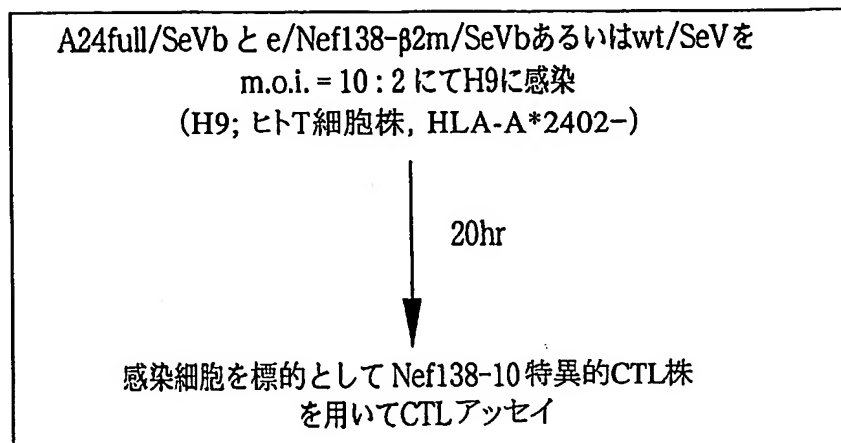


図 5

(A)



(B)

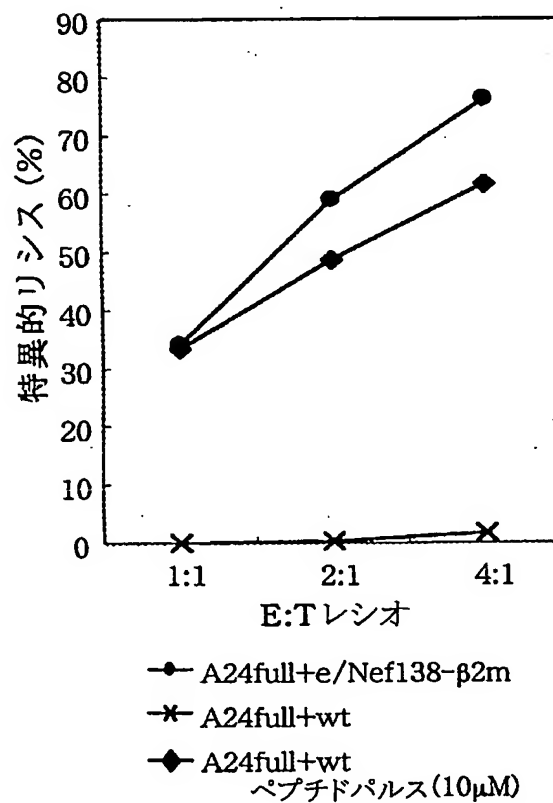
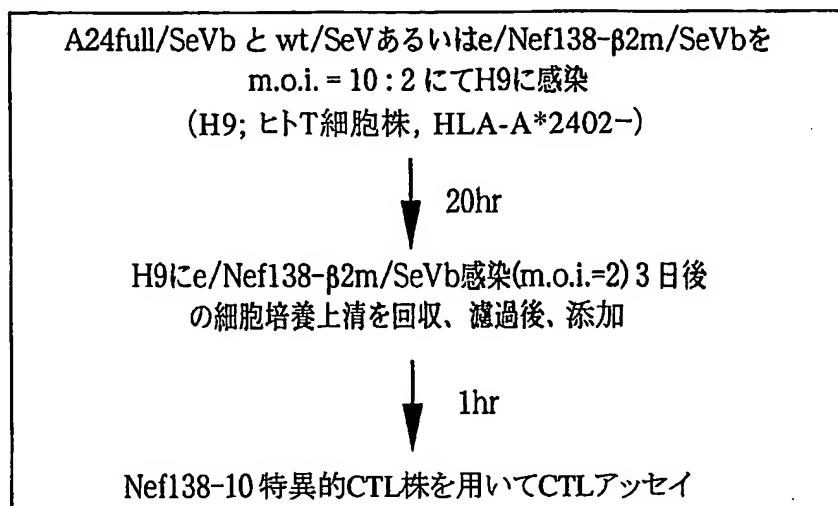
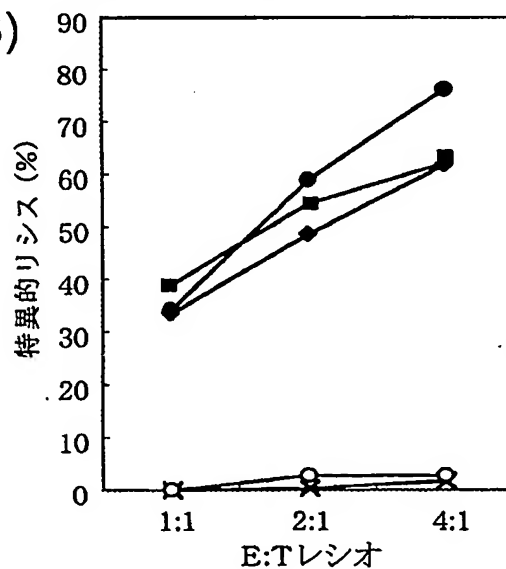


図 6

(A)



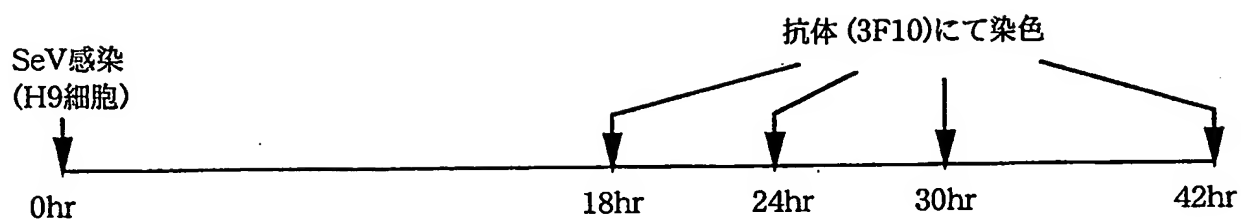
(B)



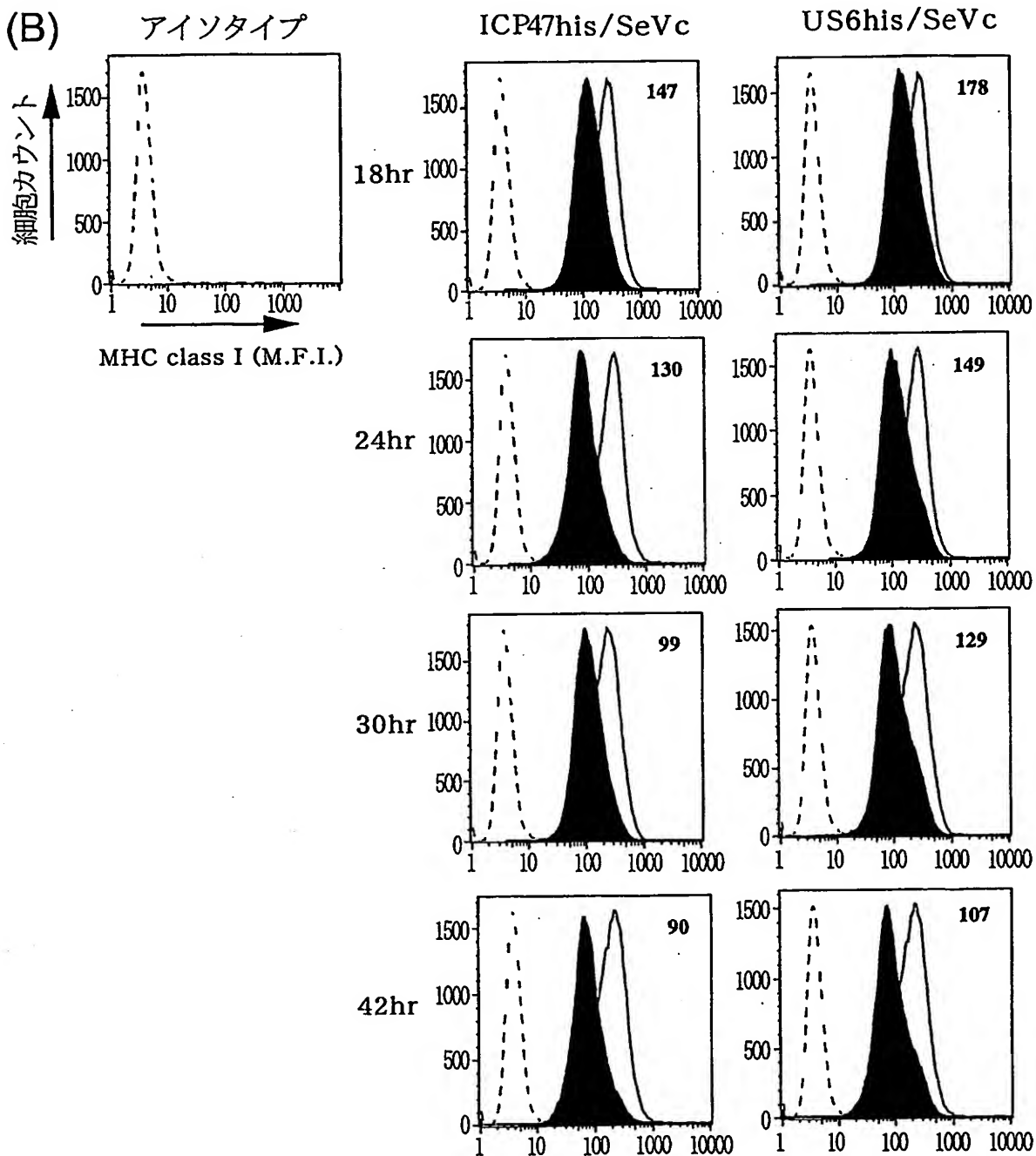
SeV感染		可溶性因子
+	A24full e/Nef138- $\beta$ 2m	-
+	A24full wt	-
+	A24full wt	ペプチド(10 $\mu$ M)
+	A24full wt	e/Nef138- $\beta$ 2m
+	A24full wt	wt

図 7

(A)

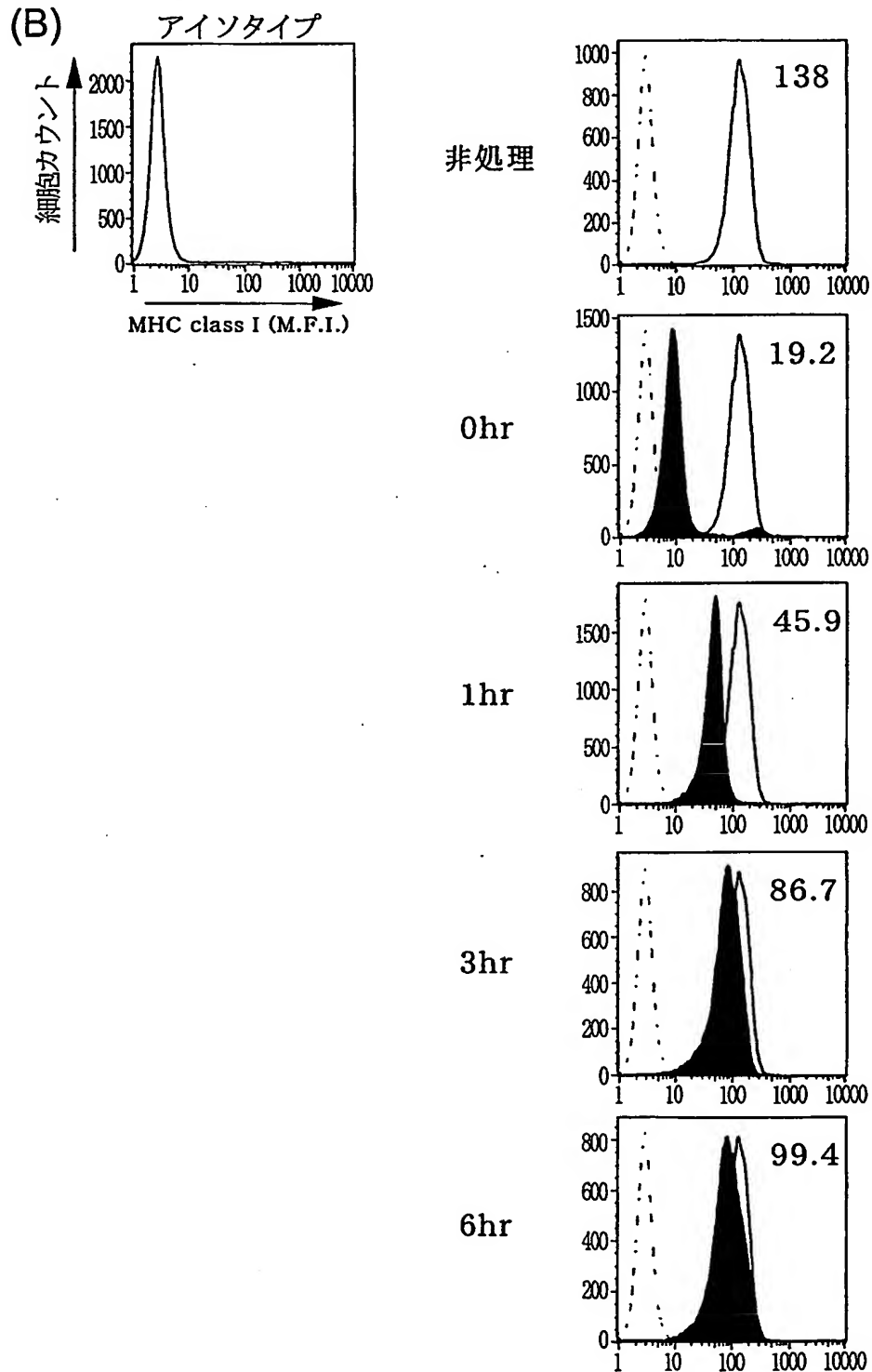
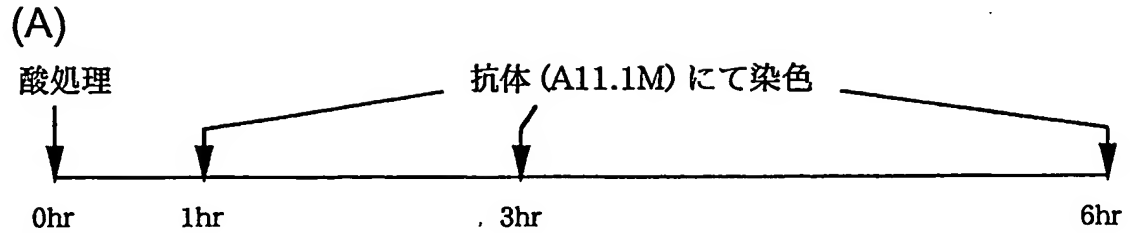


(B)



BEST AVAILABLE COPY

図 8



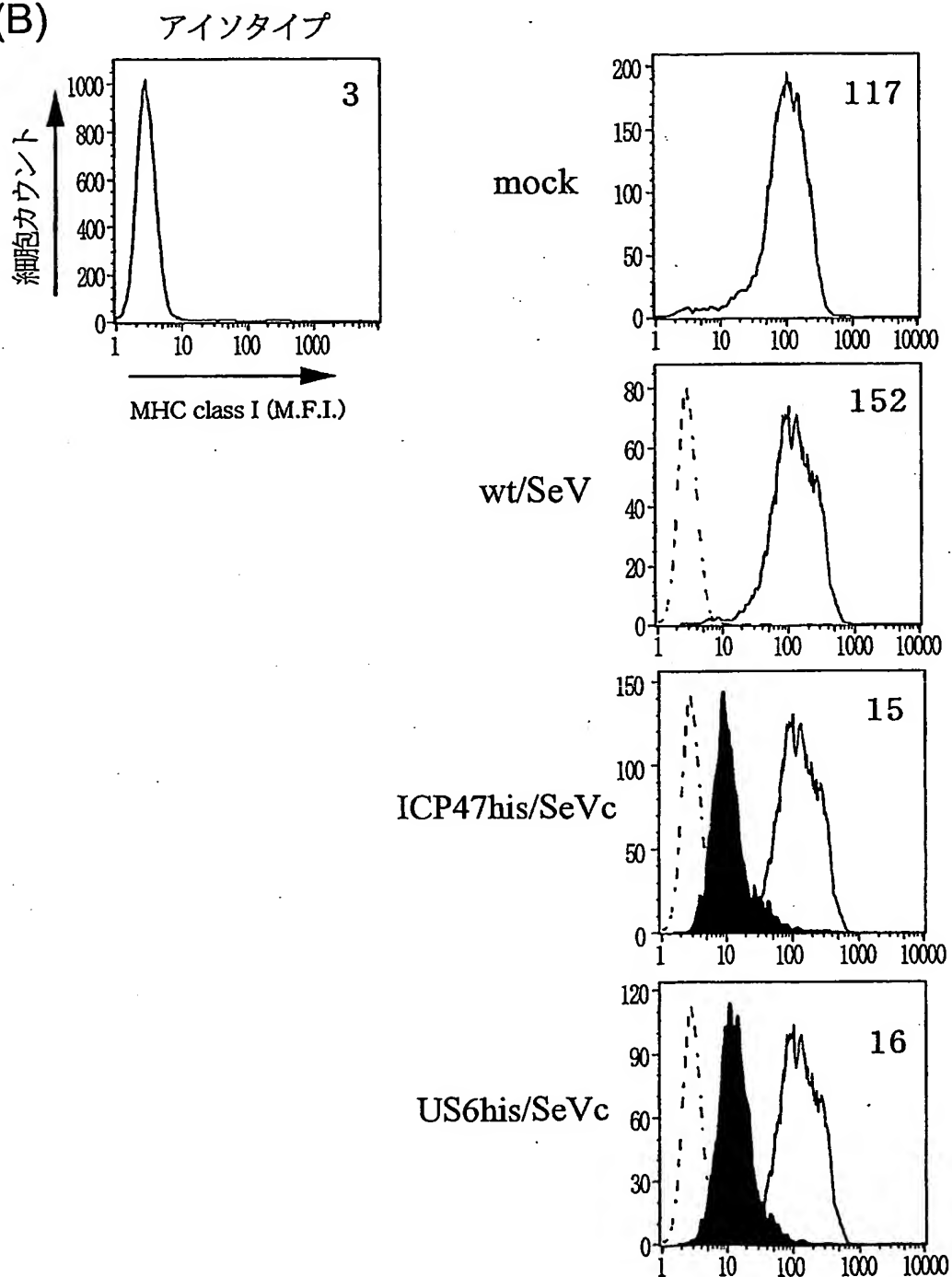
BEST AVAILABLE COPY

図 9

(A)



(B)

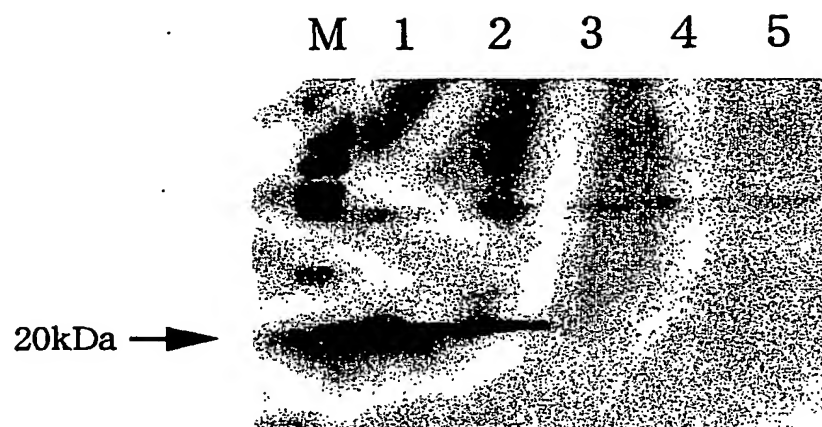


BEST AVAILABLE COPY

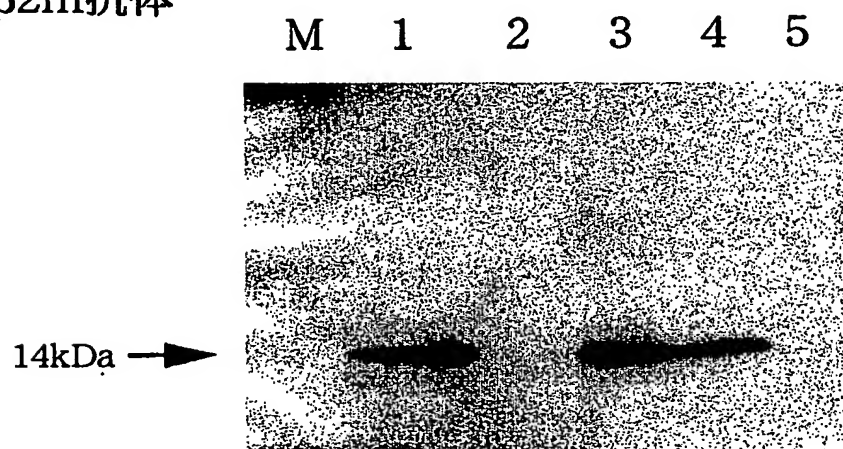


10/11

図10

(A) 抗(His)<sub>6</sub>抗体

## (B) 抗β2m抗体



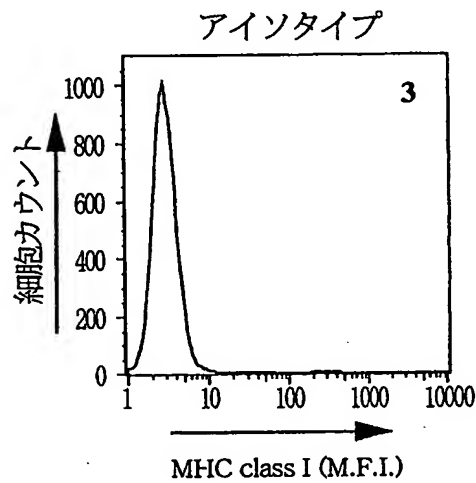
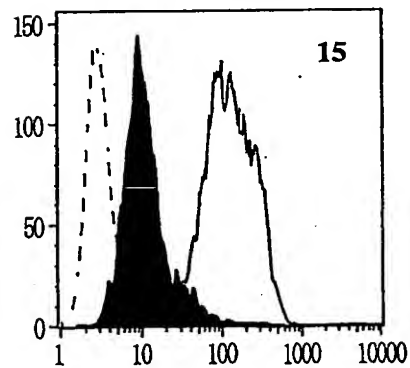
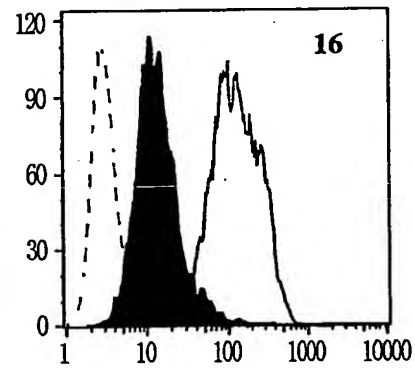
BEST AVAILABLE COPY

図 1 1

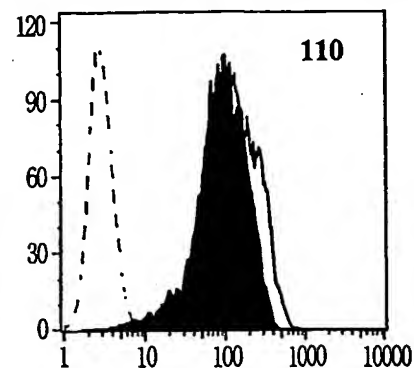
(A)



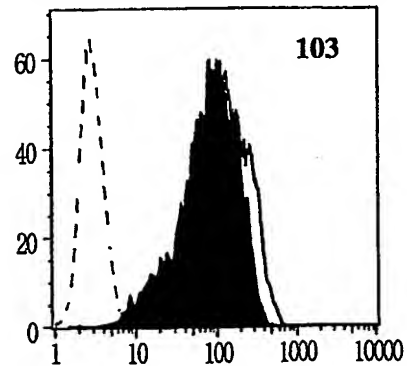
(B)

ICP47<sup>his</sup>/SeVcUS6<sup>his</sup>/SeVc

&lt;e/Nef138-β2m+ICP47&gt;/SeV



&lt;e/Nef138-β2m+US6&gt;/SeV



## SEQUENCE LISTING

<110> Dनावेक रीसर्च इं.क.

<120> Methods for enhancing MHC class I presentation of  
an exogenous epitope by inhibition of TAP activity

<130> D3-A0102P

<140>

<141>

<150> JP 2002-288394

<151> 2002-10-01

<160> 54

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 1

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 3

Gly Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1

5

10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 4

Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1

5

10

15

Ser Gly Gly Gly

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 5

Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 20 25 30

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
 synthesized sequence

<400> 6

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly  
 1 5 10

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
 synthesized sequence

<400> 7

gggcggatcc ggactcagaa tctccccaga cgccgag

37

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
 synthesized sequence

<400> 8

ccgcctcgag ctggggagga aacaggtcag catgggaac

39

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 9

ggcacgagcc gagatgtctc gtcctgtggc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 10

aatttgaat tcatccaatc caaatgcggc

30

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 11

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1

5

10

<210> 12

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 12

ggaggtggcg ggtccggagg tggttctggt ggaggttcga tccagcgtac tccaaagatt 60

<210> 13

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 13

tctggcctgg aggctagata tccactgacc tttggatggt gcttcggagg aggtggcggg 60

tcc

63

<210> 14

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 14

tctggcctgg aggctagata cctaagggat caacagctcc tagggattgg aggtggcggg 60

tcc

63

<210> 15

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 15

tgcgccgcc gtacggccga gatgtctgc tccgtggcct tagctgtgct cgcgtactc 60

tctctttctg gcctggaggc t

81

<210> 16

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 16

ttgcggccgc gatgaacttt caccctaagt ttttcttact acggcgtacg ttacatgtct 60

cgatcccact t

71

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 17

tgcgccgcc gtacggccga gatgtctgc tccgtggcct ta

42

<210> 18

<211> 80

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (21).. (80)

<400> 18

gcggccgcg tacggccgag atg tct cgc tcc gtg gcc tta gct gtg ctc gcg 53  
Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala  
1 5 10

cta ctc tct ctt tct ggc ctg gag gct 80  
Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu Ala  
15 20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 19

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala  
20

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (30)

<400> 20

aga tat cca ctg acc ttt gga tgg tgc ttc

30

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe

1

5

10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 21

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe

1

5

10

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (33)

<400> 22

aga tac cta agg gat caa cag ctc cta ggg att

33

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile

1

5

10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 23

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile

9/38

1 5 10

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (60)

&lt;400&gt; 24

gga ggt ggc ggg tcc gga ggt ggt tct ggt gga ggt tcg atc cag cgt	48
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg	
1 5 10 15	

act cca aag att	60
Thr Pro Lys Ile	
20	

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg	
1 5 10 15	

Thr Pro Lys Ile
20

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 69

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(18)

<400> 26

aag tgg gat cga gac atg taacgtacgc cgtagtaaga aaaacttagg

48

Lys Trp Asp Arg Asp Met

1

5

gtgaaagttc atcgcggccg c

69

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 27

Lys Trp Asp Arg Asp Met

1

5

<210> 28

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 28

tgcggccgcc gtacgccgag gatggccgtc atggcgcccc g

41

<210> 29

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 29

ttgcggccgc gatgaacttt caccctaagt ttttcttact acggcgtagc tcacacttta 60

caagctgtga g

71

<210> 30

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (21).. (38)

<400> 30

gcggccgccg tacgccgagg atg gcc gtc atg gcg ccc

38

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 31

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

<210> 32

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

12/38

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (18)

&lt;400&gt; 32

ctc aca gct tgt aaa gtg tgacgtacgc cgtagtaaga aaaacttagg 48

Leu Thr Ala Cys Lys Val

1 5

gtgaaagttc atcgcggccg c 69

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 33

Leu Thr Ala Cys Lys Val

1 5

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 64

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 34

tgcggccgca gtaagaaaaa cttagggtca aacgtacggc cgagatgtcg tgggccctgg 60

aaat

64

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 35

ttgcggccgc tatcaatggt ggtgatggtg gtgagctcca cgggttaccg gattac 56

<210> 36

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 36

tgcggccgcc actccttcac tatggatctc ttg 33

<210> 37

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 37

ctacggcgta cgtcaatggt ggtgatggtg gtgagctccg gagccacaac gtcgaat 57

<210> 38

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

&lt;400&gt; 38

ttgcggccgc gatgaacttt caccctaagt ttttcttact acggcgtacg tca

53

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (43).. (60)

&lt;400&gt; 39

gcggccgcag taagaaaaac ttaggggtcaa acgtacggcc gag atg tcg tgg gcc 54

Met Ser Trp Ala

1

ctg gaa

60

Leu Glu

5

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 40

Met Ser Trp Ala Leu Glu

1

5

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 55

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;



<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (42)

<400> 41

cgt aat ccg gta acc cgt gga gct cac cac cat cac cac cat	42
Arg Asn Pro Val Thr Arg Gly Ala His His His His His His	
1                      5                      10	

tgatagcggc cgc	55
----------------	----

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 42

Arg Asn Pro Val Thr Arg Gly Ala His His His His His His
1                      5                      10

<210> 43

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (41).. (58)

<400> 43

gcggccgcgag taagaaaaac ttaggtcaa agccttcact atg gat ctc ttg att	55
Met Asp Leu Leu Ile	
1                      5	

cgt	58
-----	----

Arg

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 44

Met Asp Leu Leu Ile Arg

1

5

<210> 45

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (42)

<400> 45

att cga cgt tgt ggc tcc gga gct cac cac cat cac cac cat

42

Ile Arg Arg Cys Gly Ser Gly Ala His His His His His

1

5

10

tgatagcggc cgc

55

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 46

Ile Arg Arg Cys Gly Ser Gly Ala His His His His His

1

5

10

<210>	47
<211>	2960
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens

```
<220>
<221> CDS
<222> (165).. (2588)
<223>
```

<400> 47	
ggcagcaggg tgtgcgtgat ggagaaaatt gggcaccagg gctgctcccg agattctcag	60
atctgatttc cacgcttgct accaaaatag tctgggcagg ccacttttgg aagtaggcgt	120
tatctagtga gcaggcggcc gctttcgatt tcgctttccc ctaa atg gct gag ctt	176
	Met Ala Glu Leu
	1
ctc gcc agc gca gga tca gcc tgt tcc tgg gac ttt ccg aga gcc ccg	224
Leu Ala Ser Ala Gly Ser Ala Cys Ser Trp Asp Phe Pro Arg Ala Pro	
5 10 15 20	
ccc tcg ttc cct ccc cca gcc gcc agt agg gga gga ctc ggc ggt acc	272
Pro Ser Phe Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Gly Gly Leu Gly Gly Thr	
25 30 35	
cgg agc ttc agg ccc cac cgg ggc gcg gag agt ccc agg ccc ggc cgg	320
Arg Ser Phe Arg Pro His Arg Gly Ala Glu Ser Pro Arg Pro Gly Arg	
40 45 50	
gac cgg gac ggc gtc cga gtg cca atg gct agc tct agg tgt ccc gct	368
Asp Arg Asp Gly Val Arg Val Pro Met Ala Ser Ser Arg Cys Pro Ala	
55 60 65	
ccc cgc ggg tgc cgc tgc ctc ccc gga gct tct ctc gca tgg ctg ggg	416
Pro Arg Gly Cys Arg Cys Leu Pro Gly Ala Ser Leu Ala Trp Leu Gly	
70 75 80	
aca gta ctg cta ctt ctc gcc gac tgg gtg ctg ctc cgg acc gcg ctg	464
Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Asp Trp Val Leu Leu Arg Thr Ala Leu	
85 90 95 100	
ccc cgc ata ttc tcc ctg ctg gtg ccc acc gcg ctg cca ctg ctc cgg	512

Pro Arg Ile Phe Ser Leu Leu Val Pro Thr Ala Leu Pro Leu Leu Arg	
105 110 115	
gtc tgg gcg gtg ggc ctg agc cgc tgg gcc gtg ctc tgg ctg ggg gcc	560
Val Trp Ala Val Gly Leu Ser Arg Trp Ala Val Leu Trp Leu Gly Ala	
120 125 130	
tgc ggg gtc ctc agg gca acg gtt ggc tcc aag agc gaa aac gca ggt	608
Cys Gly Val Leu Arg Ala Thr Val Gly Ser Lys Ser Glu Asn Ala Gly	
135 140 145	
gcc cag ggc tgg ctg gct gct ttg aag cca tta gct gcg gca ctg ggc	656
Ala Gln Gly Trp Leu Ala Ala Leu Lys Pro Leu Ala Ala Ala Leu Gly	
150 155 160	
ttg gcc ctg ccg gga ctt gcc ttg ttc cga gag ctg atc tca tgg gga	704
Leu Ala Leu Pro Gly Leu Ala Leu Phe Arg Glu Leu Ile Ser Trp Gly	
165 170 175 180	
gcc ccc ggg tcc gcg gat agc acc agg cta ctg cac tgg gga agt cac	752
Ala Pro Gly Ser Ala Asp Ser Thr Arg Leu Leu His Trp Gly Ser His	
185 190 195	
cct acc gcc ttc gtt gtc agt tat gca gcg gca ctg ccc gca gca gcc	800
Pro Thr Ala Phe Val Val Ser Tyr Ala Ala Ala Leu Pro Ala Ala Ala	
200 205 210	
ctg tgg cac aaa ctc ggg agc ctc tgg gtg ccc ggc ggt cag ggc ggc	848
Leu Trp His Lys Leu Gly Ser Leu Trp Val Pro Gly Gly Gln Gly Gly	
215 220 225	
tct gga aac cct gtg cgt cgg ctt cta ggc tgc ctg ggc tcg gag acg	896
Ser Gly Asn Pro Val Arg Arg Leu Leu Gly Cys Leu Gly Ser Glu Thr	
230 235 240	
cgc cgc ctc tcg ctg ttc ctg gtc ctg gtg gtc ctc tcc tct ctt ggg	944
Arg Arg Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Val Val Leu Ser Ser Leu Gly	
245 250 255 260	
gag atg gcc att cca ttc ttt acg ggc cgc ctc act gac tgg att cta	992
Glu Met Ala Ile Pro Phe Phe Thr Gly Arg Leu Thr Asp Trp Ile Leu	
265 270 275	
caa gat ggc tca gcc gat acc ttc act cga aac tta act ctc atg tcc	1040

19/38

Gln Asp Gly Ser Ala Asp Thr Phe Thr Arg Asn Leu Thr Leu Met Ser	
280	285 290
att ctc acc ata gcc agt gca gtg ctg gag ttc gtg ggt gac ggg atc	1088
Ile Leu Thr Ile Ala Ser Ala Val Leu Glu Phe Val Gly Asp Gly Ile	
295	300 305
tat aac aac acc atg ggc cac gtg cac agc cac ttg cag gga gag gtg	1136
Tyr Asn Asn Thr Met Gly His Val His Ser His Leu Gln Gly Glu Val	
310	315 320
ttt ggg gct gtc ctg cgc cag gag acg gag ttt ttc caa cag aac cag	1184
Phe Gly Ala Val Leu Arg Gln Glu Thr Glu Phe Phe Gln Gln Asn Gln	
325	330 335 340
aca ggt aac atc atg tct cgg gta aca gag gac acg tcc acc ctg agt	1232
Thr Gly Asn Ile Met Ser Arg Val Thr Glu Asp Thr Ser Thr Leu Ser	
345	350 355
gat tct ctg agt gag aat ctg agc tta ttt ctg tgg tac ctg gtg cga	1280
Asp Ser Leu Ser Glu Asn Leu Ser Leu Phe Leu Trp Tyr Leu Val Arg	
360	365 370
ggc cta tgt ctc ttg ggg atc atg ctc tgg gga tca gtg tcc ctc acc	1328
Gly Leu Cys Leu Leu Gly Ile Met Leu Trp Gly Ser Val Ser Leu Thr	
375	380 385
atg gtc acc ctg atc acc ctg cct ctg ctt ttc ctt ctg ccc aag aag	1376
Met Val Thr Leu Ile Thr Leu Pro Leu Leu Phe Leu Leu Pro Lys Lys	
390	395 400
gtg gga aaa tgg tac cag ttg ctg gaa gtg cag gtg cgg gaa tct ctg	1424
Val Gly Lys Trp Tyr Gln Leu Leu Glu Val Gln Val Arg Glu Ser Leu	
405	410 415 420
gca aag tcc agc cag gtg gcc att gag gct ctg tcg gcc atg cct aca	1472
Ala Lys Ser Ser Gln Val Ala Ile Glu Ala Leu Ser Ala Met Pro Thr	
425	430 435
gtt cga agc ttt gcc aac gag gag ggc gaa gcc cag aag ttt agg gaa	1520
Val Arg Ser Phe Ala Asn Glu Glu Gly Glu Ala Gln Lys Phe Arg Glu	
440	445 450
aag ctg caa gaa ata aag aca ctc aac cag aag gag gct gtg gcc tat	1568

Lys Leu Gln Glu Ile Lys Thr Leu Asn Gln Lys Glu Ala Val Ala Tyr	
455	460
465	
gca gtc aac tcc tgg acc act agt att tca ggt atg ctg ctg aaa gtg	1616
Ala Val Asn Ser Trp Thr Thr Ser Ile Ser Gly Met Leu Leu Lys Val	
470	475
480	
gga atc ctc tac att ggt ggg cag ctg gtg acc agt ggg gct gta agc	1664
Gly Ile Leu Tyr Ile Gly Gly Gln Leu Val Thr Ser Gly Ala Val Ser	
485	490
495	500
agt ggg aac ctt gtc aca ttt gtt ctc tac cag atg cag ttc acc cag	1712
Ser Gly Asn Leu Val Thr Phe Val Leu Tyr Gln Met Gln Phe Thr Gln	
505	510
515	
gct gtg gag gta ctg ctc tcc atc tac ccc aga gta cag aag gct gtg	1760
Ala Val Glu Val Leu Leu Ser Ile Tyr Pro Arg Val Gln Lys Ala Val	
520	525
530	
ggc tcc tca gag aaa ata ttt gag tac ctg gac cgc acc cct cgc tgc	1808
Gly Ser Ser Glu Lys Ile Phe Glu Tyr Leu Asp Arg Thr Pro Arg Cys	
535	540
545	
cca ccc agt ggt ctg ttg act ccc tta cac ttg gag ggc ctt gtc cag	1856
Pro Pro Ser Gly Leu Leu Thr Pro Leu His Leu Glu Gly Leu Val Gln	
550	555
560	
ttc caa gat gtc tcc ttt gcc tac cca aac cgc cca gat gtc tta gtg	1904
Phe Gln Asp Val Ser Phe Ala Tyr Pro Asn Arg Pro Asp Val Leu Val	
565	570
575	580
cta cag ggg ctg aca ttc acc cta cgc cct ggc gag gtg acg gcg ctg	1952
Leu Gln Gly Leu Thr Phe Thr Leu Arg Pro Gly Glu Val Thr Ala Leu	
585	590
595	
gtg gga ccc aat ggg tct ggg aag agc aca gtg gct gcc ctg ctg cag	2000
Val Gly Pro Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Val Ala Ala Leu Leu Gln	
600	605
610	
aat ctg tac cag ccc acc ggg gga cag ctg ctg ttg gat ggg aag ccc	2048
Asn Leu Tyr Gln Pro Thr Gly Gly Gln Leu Leu Leu Asp Gly Lys Pro	
615	620
625	
ctt ccc caa tat gag cac cgc tac ctg cac agg cag gtg gct gca gtg	2096

Leu Pro Gln Tyr Glu His Arg Tyr Leu His Arg Gln Val Ala Ala Val	
630                                  635                                  640	
gga caa gag cca cag gta ttt gga aga agt ctt caa gaa aat att gcc	2144
Gly Gln Glu Pro Gln Val Phe Gly Arg Ser Leu Gln Glu Asn Ile Ala	
645                                  650                                  655                                  660	
tat ggc ctg acc cag aag cca act atg gag gaa atc aca gct gct gca	2192
Tyr Gly Leu Thr Gln Lys Pro Thr Met Glu Glu Ile Thr Ala Ala Ala	
665                                  670                                  675	
gta aag tct ggg gcc cat agt ttc atc tct gga ctc cct cag ggc tat	2240
Val Lys Ser Gly Ala His Ser Phe Ile Ser Gly Leu Pro Gln Gly Tyr	
680                                  685                                  690	
gac aca gag gta gac gag gct ggg agc cag ctg tca ggg ggt cag cga	2288
Asp Thr Glu Val Asp Glu Ala Gly Ser Gln Leu Ser Gly Gly Gln Arg	
695                                  700                                  705	
cag gca gtg gcg ttg gcc cga gca ttg atc cgg aaa ccg tgt gta ctt	2336
Gln Ala Val Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ile Arg Lys Pro Cys Val Leu	
710                                  715                                  720	
atc ctg gat gat gcc acc agt gcc ctg gat gca aac agc cag tta cag	2384
Ile Leu Asp Asp Ala Thr Ser Ala Leu Asp Ala Asn Ser Gln Leu Gln	
725                                  730                                  735                                  740	
gtg gag cag ctc ctg tac gaa agc cct gag cgg tac tcc cgc tca gtg	2432
Val Glu Gln Leu Leu Tyr Glu Ser Pro Glu Arg Tyr Ser Arg Ser Val	
745                                  750                                  755	
ctt ctc atc acc cag cac ctc agc ctg gtg gag cag gct gac cac atc	2480
Leu Leu Ile Thr Gln His Leu Ser Leu Val Glu Gln Ala Asp His Ile	
760                                  765                                  770	
ctc ttt ctg gaa gga ggc gct atc cgg gag ggg gga acc cac cag cag	2528
Leu Phe Leu Glu Gly Gly Ala Ile Arg Glu Gly Gly Thr His Gln Gln	
775                                  780                                  785	
ctc atg gag aaa aag ggg tgc tac tgg gcc atg gtg cag gct cct gca	2576
Leu Met Glu Lys Lys Gly Cys Tyr Trp Ala Met Val Gln Ala Pro Ala	
790                                  795                                  800	
gat gct cca gaa tgaaagcctt ctcagacctg cgcaactccat ctccttcctt	2628

22/38

Asp Ala Pro Glu

805

```

tttcttctct ctgtggtgga gaaccacage tgcagagtag gcagctgcct ccaggatgag 2688
ttacttgaaa ttgaccttga gtgtgttacc tcctttccaa gtcctcgtg ataatgcaga 2748
cttcctggag tacaaacaca ggatttgtaa ttccttactg taacggagtt tagagccagg 2808
gctgatgctt tgggtgggcc agcactctga aactgagaaa tggtcagaat gtacggaaag 2868
atgatcagct attttcaaca taactgaagg catatgctgg ccataaaca ccctgtaggt 2928
tcttgatatt tataataaaa ttggtgtttt gt 2960

```

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 808

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 48

```

Met Ala Glu Leu Leu Ala Ser Ala Gly Ser Ala Cys Ser Trp Asp Phe
1           5           10           15

```

```

Pro Arg Ala Pro Pro Ser Phe Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Gly Gly
20           25           30

```

```

Leu Gly Gly Thr Arg Ser Phe Arg Pro His Arg Gly Ala Glu Ser Pro
35           40           45

```

```

Arg Pro Gly Arg Asp Arg Asp Gly Val Arg Val Pro Met Ala Ser Ser
50           55           60

```

```

Arg Cys Pro Ala Pro Arg Gly Cys Arg Cys Leu Pro Gly Ala Ser Leu
65           70           75           80

```

```

Ala Trp Leu Gly Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Asp Trp Val Leu Leu
85           90           95

```

```

Arg Thr Ala Leu Pro Arg Ile Phe Ser Leu Leu Val Pro Thr Ala Leu
100          105          110

```



Pro Leu Leu Arg Val Trp Ala Val Gly Leu Ser Arg Trp Ala Val Leu  
115 120 125

Trp Leu Gly Ala Cys Gly Val Leu Arg Ala Thr Val Gly Ser Lys Ser  
130 135 140

Glu Asn Ala Gly Ala Gln Gly Trp Leu Ala Ala Leu Lys Pro Leu Ala  
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Leu Ala Leu Pro Gly Leu Ala Leu Phe Arg Glu Leu  
165 170 175

Ile Ser Trp Gly Ala Pro Gly Ser Ala Asp Ser Thr Arg Leu Leu His  
180 185 190

Trp Gly Ser His Pro Thr Ala Phe Val Val Ser Tyr Ala Ala Ala Leu  
195 200 205

Pro Ala Ala Ala Leu Trp His Lys Leu Gly Ser Leu Trp Val Pro Gly  
210 215 220

Gly Gln Gly Gly Ser Gly Asn Pro Val Arg Arg Leu Leu Gly Cys Leu  
225 230 235 240

Gly Ser Glu Thr Arg Arg Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Val Val Leu  
245 250 255

Ser Ser Leu Gly Glu Met Ala Ile Pro Phe Phe Thr Gly Arg Leu Thr  
260 265 270

Asp Trp Ile Leu Gln Asp Gly Ser Ala Asp Thr Phe Thr Arg Asn Leu  
275 280 285

Thr Leu Met Ser Ile Leu Thr Ile Ala Ser Ala Val Leu Glu Phe Val  
290 295 300

Gly Asp Gly Ile Tyr Asn Asn Thr Met Gly His Val His Ser His Leu  
305 310 315 320

Gln Gly Glu Val Phe Gly Ala Val Leu Arg Gln Glu Thr Glu Phe Phe  
325 330 335

Gln Gln Asn Gln Thr Gly Asn Ile Met Ser Arg Val Thr Glu Asp Thr  
340 345 350

Ser Thr Leu Ser Asp Ser Leu Ser Glu Asn Leu Ser Leu Phe Leu Trp  
355 360 365

Tyr Leu Val Arg Gly Leu Cys Leu Leu Gly Ile Met Leu Trp Gly Ser  
370 375 380

Val Ser Leu Thr Met Val Thr Leu Ile Thr Leu Pro Leu Leu Phe Leu  
385 390 395 400

Leu Pro Lys Lys Val Gly Lys Trp Tyr Gln Leu Leu Glu Val Gln Val  
405 410 415

Arg Glu Ser Leu Ala Lys Ser Ser Gln Val Ala Ile Glu Ala Leu Ser  
420 425 430

Ala Met Pro Thr Val Arg Ser Phe Ala Asn Glu Glu Gly Glu Ala Gln  
435 440 445

Lys Phe Arg Glu Lys Leu Gln Glu Ile Lys Thr Leu Asn Gln Lys Glu  
450 455 460

Ala Val Ala Tyr Ala Val Asn Ser Trp Thr Thr Ser Ile Ser Gly Met  
465 470 475 480

Leu Leu Lys Val Gly Ile Leu Tyr Ile Gly Gly Gln Leu Val Thr Ser  
485 490 495

Gly Ala Val Ser Ser Gly Asn Leu Val Thr Phe Val Leu Tyr Gln Met  
500 505 510

Gln Phe Thr Gln Ala Val Glu Val Leu Leu Ser Ile Tyr Pro Arg Val  
515 520 525

Gln Lys Ala Val Gly Ser Ser Glu Lys Ile Phe Glu Tyr Leu Asp Arg  
530 535 540

Thr Pro Arg Cys Pro Pro Ser Gly Leu Leu Thr Pro Leu His Leu Glu  
545 550 555 560

Gly Leu Val Gln Phe Gln Asp Val Ser Phe Ala Tyr Pro Asn Arg Pro  
565 570 575

Asp Val Leu Val Leu Gln Gly Leu Thr Phe Thr Leu Arg Pro Gly Glu

25/38

580

585

590

Val Thr Ala Leu Val Gly Pro Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Val Ala  
595 600 605

Ala Leu Leu Gln Asn Leu Tyr Gln Pro Thr Gly Gly Gln Leu Leu Leu  
610 615 620

Asp Gly Lys Pro Leu Pro Gln Tyr Glu His Arg Tyr Leu His Arg Gln  
625 630 635 640

Val Ala Ala Val Gly Gln Glu Pro Gln Val Phe Gly Arg Ser Leu Gln  
645 650 655

Glu Asn Ile Ala Tyr Gly Leu Thr Gln Lys Pro Thr Met Glu Glu Ile  
660 665 670

Thr Ala Ala Ala Val Lys Ser Gly Ala His Ser Phe Ile Ser Gly Leu  
675 680 685

Pro Gln Gly Tyr Asp Thr Glu Val Asp Glu Ala Gly Ser Gln Leu Ser  
690 695 700

Gly Gly Gln Arg Gln Ala Val Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ile Arg Lys  
705 710 715 720

Pro Cys Val Leu Ile Leu Asp Asp Ala Thr Ser Ala Leu Asp Ala Asn  
725 730 735

Ser Gln Leu Gln Val Glu Gln Leu Leu Tyr Glu Ser Pro Glu Arg Tyr  
740 745 750

Ser Arg Ser Val Leu Leu Ile Thr Gln His Leu Ser Leu Val Glu Gln  
755 760 765

Ala Asp His Ile Leu Phe Leu Glu Gly Gly Ala Ile Arg Glu Gly Gly  
770 775 780

Thr His Gln Gln Leu Met Glu Lys Lys Gly Cys Tyr Trp Ala Met Val  
785 790 795 800

Gln Ala Pro Ala Asp Ala Pro Glu  
805

<210> 49  
 <211> 3719  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (97)..(2205)  
 <223>

<400> 349  
 ggaccagagc cggtagcgag gttgggagag acggagcgga cctcagcgct gaagcagaag 60  
 tccccggagc tgcggtctcc ccgccgcggc tgagcc atg cgg ctc cct gac ctg 114  
 Met Arg Leu Pro Asp Leu  
 1 5  
 aga ccc tgg acc tcc ctg ctg ctg gtg gac gcg gct tta ctg tgg ctg 162  
 Arg Pro Trp Thr Ser Leu Leu Leu Val Asp Ala Ala Leu Leu Trp Leu  
 10 15 20  
 ctt cag ggc cct ctg ggg act ttg ctt cct caa ggg ctg cca gga cta 210  
 Leu Gln Gly Pro Leu Gly Thr Leu Leu Pro Gln Gly Leu Pro Gly Leu  
 25 30 35  
 tgg ctg gag ggg acc ctg cgg ctg gga ggg ctg tgg ggg ctg cta aag 258  
 Trp Leu Glu Gly Thr Leu Arg Leu Gly Gly Leu Trp Gly Leu Leu Lys  
 40 45 50  
 cta aga ggg ctg ctg gga ttt gtg ggg aca ctg ctg ctc ccg ctc tgt 306  
 Leu Arg Gly Leu Leu Gly Phe Val Gly Thr Leu Leu Leu Pro Leu Cys  
 55 60 65 70  
 ctg gcc acc ccc ctg act gtc tcc ctg aga gcc ctg gtc gcg ggg gcc 354  
 Leu Ala Thr Pro Leu Thr Val Ser Leu Arg Ala Leu Val Ala Gly Ala  
 75 80 85  
 tca cgt gct ccc cca gcc aga gtc gct tca gcc cct tgg agc tgg ctg 402  
 Ser Arg Ala Pro Pro Ala Arg Val Ala Ser Ala Pro Trp Ser Trp Leu  
 90 95 100  
 ctg gtg ggg tac ggg gct gcg ggg ctc agc tgg tca ctg tgg gct gtt 450  
 Leu Val Gly Tyr Gly Ala Ala Gly Leu Ser Trp Ser Leu Trp Ala Val

27/38

105	110	115	
ctg agc cct cct gga gcc cag gag aag gag cag gac cag gtg aac aac			498
Leu Ser Pro Pro Gly Ala Gln Glu Lys Glu Gln Asp Gln Val Asn Asn			
120	125	130	
aaa gtc ttg atg tgg agg ctg ctg aag ctc tcc agg ccg gac ctg cct			546
Lys Val Leu Met Trp Arg Leu Leu Lys Leu Ser Arg Pro Asp Leu Pro			
135	140	145	150
ctc ctc gtt gcc gcc ttc ttc ttc ctt gtc ctt gct gtt ttg ggt gag			594
Leu Leu Val Ala Ala Phe Phe Phe Leu Val Leu Ala Val Leu Gly Glu			
155	160	165	
aca tta atc cct cac tat tct ggt cgt gtg att gac atc ctg gga ggt			642
Thr Leu Ile Pro His Tyr Ser Gly Arg Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly			
170	175	180	
gat ttt gac ccc cat gcc ttt gcc agt gcc atc ttc ttc atg tgc ctc			690
Asp Phe Asp Pro His Ala Phe Ala Ser Ala Ile Phe Phe Met Cys Leu			
185	190	195	
ttc tcc ttt ggc agc tca ctg tct gca ggc tgc cga gga ggc tgc ttc			738
Phe Ser Phe Gly Ser Ser Leu Ser Ala Gly Cys Arg Gly Gly Cys Phe			
200	205	210	
acc tac acc atg tct cga atc aac ttg cgg atc cgg gag cag ctt ttc			786
Thr Tyr Thr Met Ser Arg Ile Asn Leu Arg Ile Arg Glu Gln Leu Phe			
215	220	225	230
tcc tcc ctg ctg cgc cag gac ctc ggt ttc ttc cag gag act aag aca			834
Ser Ser Leu Leu Arg Gln Asp Leu Gly Phe Phe Gln Glu Thr Lys Thr			
235	240	245	
ggg gag ctg aac tca cgg ctg agc tcg gat acc acc ctg atg agt aac			882
Gly Glu Leu Asn Ser Arg Leu Ser Ser Asp Thr Thr Leu Met Ser Asn			
250	255	260	
tgg ctt cct tta aat gcc aat gtg ctc ttg cga agc ctg gtg aaa gtg			930
Trp Leu Pro Leu Asn Ala Asn Val Leu Leu Arg Ser Leu Val Lys Val			
265	270	275	
gtg ggg ctg tat ggc ttc atg ctc agc ata tcg cct cga ctc acc ctc			978
Val Gly Leu Tyr Gly Phe Met Leu Ser Ile Ser Pro Arg Leu Thr Leu			

280	285	290	
ctt tct ctg ctg cac atg ccc ttc aca ata gca gcg gag aag gtg tac			1026
Leu Ser Leu Leu His Met Pro Phe Thr Ile Ala Ala Glu Lys Val Tyr			
295	300	305	310
aac acc cgc cat cag gaa gtg ctt cgg gag atc cag gat gca gtg gcc			1074
Asn Thr Arg His Gln Glu Val Leu Arg Glu Ile Gln Asp Ala Val Ala			
	315	320	325
agg gcg ggg cag gtg gtg cgg gaa gcc gtt gga ggg ctg cag acc gtt			1122
Arg Ala Gly Gln Val Val Arg Glu Ala Val Gly Gly Leu Gln Thr Val			
	330	335	340
cgc agt ttt ggg gcc gag gag cat gaa gtc tgt cgc tat aaa gag gcc			1170
Arg Ser Phe Gly Ala Glu Glu His Glu Val Cys Arg Tyr Lys Glu Ala			
	345	350	355
ctt gaa caa tgt cgg cag ctg tat tgg cgg aga gac ctg gaa cgc gcc			1218
Leu Glu Gln Cys Arg Gln Leu Tyr Trp Arg Arg Asp Leu Glu Arg Ala			
	360	365	370
ttg tac ctg ctc ata agg agg gtg ctg cac ttg ggg gtg cag atg ctg			1266
Leu Tyr Leu Leu Ile Arg Arg Val Leu His Leu Gly Val Gln Met Leu			
	375	380	385
atg ctg agc tgt ggg ctg cag cag atg cag gat ggg gag ctc acc cag			1314
Met Leu Ser Cys Gly Leu Gln Gln Met Gln Asp Gly Glu Leu Thr Gln			
	395	400	405
ggc agc ctg ctt tcc ttt atg atc tac cag gag agc gtg ggg agc tat			1362
Gly Ser Leu Leu Ser Phe Met Ile Tyr Gln Glu Ser Val Gly Ser Tyr			
	410	415	420
gtg cag acc ctg gta tac ata tat ggg gat atg ctc agc aac gtg gga			1410
Val Gln Thr Leu Val Tyr Ile Tyr Gly Asp Met Leu Ser Asn Val Gly			
	425	430	435
gct gca gag aag gtt ttc tcc tac atg gac cga cag cca aat ctg cct			1458
Ala Ala Glu Lys Val Phe Ser Tyr Met Asp Arg Gln Pro Asn Leu Pro			
	440	445	450
tca cct ggc acg ctt gcc ccc acc act ctg cag ggg gtt gtg aaa ttc			1506
Ser Pro Gly Thr Leu Ala Pro Thr Thr Leu Gln Gly Val Val Lys Phe			

29/38

455	460	465	470	
caa gac gtc tcc ttt gca tat ccc aat cgc cct gac agg cct gtg ctc				1554
Gln Asp Val Ser Phe Ala Tyr Pro Asn Arg Pro Asp Arg Pro Val Leu				
	475	480	485	
aag ggg ctg acg ttt acc cta cgt cct ggt gag gtg acg gcg ctg gtg				1602
Lys Gly Leu Thr Phe Thr Leu Arg Pro Gly Glu Val Thr Ala Leu Val				
	490	495	500	
gga ccc aat ggg tct ggg aag agc aca gtg gct gcc ctg ctg cag aat				1650
Gly Pro Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Val Ala Ala Leu Leu Gln Asn				
	505	510	515	
ctg tac cag ccc aca ggg gga cag gtg ctg ctg gat gaa aag ccc atc				1698
Leu Tyr Gln Pro Thr Gly Gly Gln Val Leu Leu Asp Glu Lys Pro Ile				
	520	525	530	
tca cag tat gaa cac tgc tac ctg cac agc cag gtg gtt tca gtt ggg				1746
Ser Gln Tyr Glu His Cys Tyr Leu His Ser Gln Val Val Ser Val Gly				
	535	540	545	550
cag gag cct gtg ctg ttc tcc ggt tct gtg agg aac aac att gct tat				1794
Gln Glu Pro Val Leu Phe Ser Gly Ser Val Arg Asn Asn Ile Ala Tyr				
	555	560	565	
ggg ctg cag agc tgc gaa gat gat aag gtg atg gcg gct gcc cag gct				1842
Gly Leu Gln Ser Cys Glu Asp Asp Lys Val Met Ala Ala Ala Gln Ala				
	570	575	580	
gcc cac gca gat gac ttc atc cag gaa atg gag cat gga ata tac aca				1890
Ala His Ala Asp Asp Phe Ile Gln Glu Met Glu His Gly Ile Tyr Thr				
	585	590	595	
gat gta ggg gag aag gga agc cag ctg gct gcg gga cag aaa caa cgt				1938
Asp Val Gly Glu Lys Gly Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Lys Gln Arg				
	600	605	610	
ctg gcc att gcc cgg gcc ctt gta cga gac ccg cgg gtc ctc atc ctg				1986
Leu Ala Ile Ala Arg Ala Leu Val Arg Asp Pro Arg Val Leu Ile Leu				
	615	620	625	630
gat gag gct act agt gcc cta gat gtg cag tgc gag cag gcc ctg cag				2034
Asp Glu Ala Thr Ser Ala Leu Asp Val Gln Cys Glu Gln Ala Leu Gln				

635	640	645	
gac tgg aat tcc cgt ggg gat cgc aca gtg ctg gtg att gct cac agg			2082
Asp Trp Asn Ser Arg Gly Asp Arg Thr Val Leu Val Ile Ala His Arg			
650	655	660	
ctg cag gca gtt cag cgc gcc cac cag atc ctg gtg ctc cag gag ggc			2130
Leu Gln Ala Val Gln Arg Ala His Gln Ile Leu Val Leu Gln Glu Gly			
665	670	675	
aag ctg cag aag ctt gcc cag ctc cag gag gga cag gac ctc tat tcc			2178
Lys Leu Gln Lys Leu Ala Gln Leu Gln Glu Gly Gln Asp Leu Tyr Ser			
680	685	690	
cgc ctg gtt cag cag cgg ctg atg gac tgaggcccca gggatactgg			2225
Arg Leu Val Gln Gln Arg Leu Met Asp			
695	700		
gccctcttct caggggcgtc tccaggaccc agagctgttc ctgctttgag tttccctaga			2285
gctgtgcggc cagatagctg ttcctgagtt gcaagcacga tggagatttg gacactgtgt			2345
gcttttggtg ggggtggagag gtggggtggg gtggggtgtg gtggggtggg aggctgtctg			2405
tgtccaggaa acttaattcc ctggtgacta gagctttgcc tggatgatgag gagtattttg			2465
tggcataata catatatattt aaaatatattt ctttcttacg tgaactgtat acattcatat			2525
agaaaattta gacaatataa aaaagtacaa agaagaaaag taaaagtacc cattgtttca			2585
cttcctggag ataaccatag ttgctatttt gctgcctgtc ccatcagtcg tttatctgtt			2645
gtttgagata gaaattaacc aaaaatgaca taaatattca tgagattgcc ttcctatata			2705
cttccttggt cctaccagtg tctgctattt tgaagaagct agggctctgga gggacagaga			2765
acagttccct gattaacagt attaatagcg acattggtaa cagctaccat ttatagagtt			2825
ttaatgggag taggagctat gctaagtgtt tttcatgtat tatcgttttt aatcattatc			2885
cccaacccta tgaggttggt tattatcccc attttacaga tgaggaaact gaagctcaaa			2945
gaggctcaat gactttccca aggtggtcgt agtgggtggag ttggagtttg aacacaggcc			3005



tgaccctaga gtccacaccc tgaccaatc aattatattg catcttgggt ccataaaccc 3065  
 taatccataa tcccatcaag aaaagctctg ctgctcttag ctctaaataa ttcagaatct 3125  
 attctcttct ctccagtcct gttgttatag tcttcaactca tagacttaag atgatcccat 3185  
 caccagagag gtttctctac cattagcttc cctcttccgg ccattcttca caaagtcatt 3245  
 tttctaaatt ctgtgtcaca tacgatgatg gcatttctgg aaattccttc aggtgctctc 3305  
 aagccctgct gcagagatcc ttttcagagc acacactggt ccagcccatc tgtctcaccc 3365  
 tctcctgttg tatccagctc cacgacaaac tttctgcctt cccaacacc tttgtgcctt 3425  
 tgcatatggt gttttcttgc ccattttctg ctgcactcgc ccttgatttt caagttcaag 3485  
 acttaactca gggttcaggt cttccaggag gccttactta tgtcgtcagt ctggggaact 3545  
 ctccatgtgc ttctatcaact gtgcgggttac ctctttcaca gcccttttaa agttctatct 3605  
 tccctttccc accttttttg accttccact agaccatgag cacctgggcg gaaagccata 3665  
 tatcttatta agctttatat ctgtacctg gccgagggt aattcatagt ggag 3719

<210> 50

<211> 703

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Arg Leu Pro Asp Leu Arg Pro Trp Thr Ser Leu Leu Leu Val Asp  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Leu Trp Leu Leu Gln Gly Pro Leu Gly Thr Leu Leu Pro  
 20 25 30

Gln Gly Leu Pro Gly Leu Trp Leu Glu Gly Thr Leu Arg Leu Gly Gly  
 35 40 45

Leu Trp Gly Leu Leu Lys Leu Arg Gly Leu Leu Gly Phe Val Gly Thr  
 50 55 60



Ala Ala Glu Lys Val Tyr Asn Thr Arg His Gln Glu Val Leu Arg Glu  
305 310 315 320

Ile Gln Asp Ala Val Ala Arg Ala Gly Gln Val Val Arg Glu Ala Val  
325 330 335

Gly Gly Leu Gln Thr Val Arg Ser Phe Gly Ala Glu Glu His Glu Val  
340 345 350

Cys Arg Tyr Lys Glu Ala Leu Glu Gln Cys Arg Gln Leu Tyr Trp Arg  
355 360 365

Arg Asp Leu Glu Arg Ala Leu Tyr Leu Leu Ile Arg Arg Val Leu His  
370 375 380

Leu Gly Val Gln Met Leu Met Leu Ser Cys Gly Leu Gln Gln Met Gln  
385 390 395 400

Asp Gly Glu Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Ser Phe Met Ile Tyr Gln  
405 410 415

Glu Ser Val Gly Ser Tyr Val Gln Thr Leu Val Tyr Ile Tyr Gly Asp  
420 425 430

Met Leu Ser Asn Val Gly Ala Ala Glu Lys Val Phe Ser Tyr Met Asp  
435 440 445

Arg Gln Pro Asn Leu Pro Ser Pro Gly Thr Leu Ala Pro Thr Thr Leu  
450 455 460

Gln Gly Val Val Lys Phe Gln Asp Val Ser Phe Ala Tyr Pro Asn Arg  
465 470 475 480

Pro Asp Arg Pro Val Leu Lys Gly Leu Thr Phe Thr Leu Arg Pro Gly  
485 490 495

Glu Val Thr Ala Leu Val Gly Pro Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Val  
500 505 510

Ala Ala Leu Leu Gln Asn Leu Tyr Gln Pro Thr Gly Gly Gln Val Leu  
515 520 525

Leu Asp Glu Lys Pro Ile Ser Gln Tyr Glu His Cys Tyr Leu His Ser

530	535	540
Gln Val Val Ser Val Gly Gln Glu Pro Val Leu Phe Ser Gly Ser Val		
545	550	555 560
Arg Asn Asn Ile Ala Tyr Gly Leu Gln Ser Cys Glu Asp Asp Lys Val		
565	570	575
Met Ala Ala Ala Gln Ala Ala His Ala Asp Asp Phe Ile Gln Glu Met		
580	585	590
Glu His Gly Ile Tyr Thr Asp Val Gly Glu Lys Gly Ser Gln Leu Ala		
595	600	605
Ala Gly Gln Lys Gln Arg Leu Ala Ile Ala Arg Ala Leu Val Arg Asp		
610	615	620
Pro Arg Val Leu Ile Leu Asp Glu Ala Thr Ser Ala Leu Asp Val Gln		
625	630	635 640
Cys Glu Gln Ala Leu Gln Asp Trp Asn Ser Arg Gly Asp Arg Thr Val		
645	650	655
Leu Val Ile Ala His Arg Leu Gln Ala Val Gln Arg Ala His Gln Ile		
660	665	670
Leu Val Leu Gln Glu Gly Lys Leu Gln Lys Leu Ala Gln Leu Gln Glu		
675	680	685
Gly Gln Asp Leu Tyr Ser Arg Leu Val Gln Gln Arg Leu Met Asp		
690	695	700

<210> 51  
 <211> 264  
 <212> DNA  
 <213> human herpesvirus 1

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (264)  
 <223>

<400> 51

35/38

atg tcg tgg gcc ctg gaa atg gcg gac acc ttc ctg gac acc atg cgg 48  
 Met Ser Trp Ala Leu Glu Met Ala Asp Thr Phe Leu Asp Thr Met Arg  
 1 5 10 15  
  
 gtt ggg ccc agg acg tac gcc gac gta cgc gat gag atc aat aaa agg 96  
 Val Gly Pro Arg Thr Tyr Ala Asp Val Arg Asp Glu Ile Asn Lys Arg  
 20 25 30  
  
 ggg cgt gag gac cgg gag gcg gcc aga acc gcc gtg cac gac ccg gag 144  
 Gly Arg Glu Asp Arg Glu Ala Ala Arg Thr Ala Val His Asp Pro Glu  
 35 40 45  
  
 cgt ccc ctg ctg cgc tct ccc ggg ctg ctg ccc gaa atc gcc ccc aac 192  
 Arg Pro Leu Leu Arg Ser Pro Gly Leu Leu Pro Glu Ile Ala Pro Asn  
 50 55 60  
  
 gca tcc ttg ggt gtg gca cat cga aga acc ggc ggg acc gtg acc gac 240  
 Ala Ser Leu Gly Val Ala His Arg Arg Thr Gly Gly Thr Val Thr Asp  
 65 70 75 80  
  
 agt ccc cgt aat ccg gta acc cgt 264  
 Ser Pro Arg Asn Pro Val Thr Arg  
 85

<210> 52  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> human herpesvirus 1

<400> 52

Met Ser Trp Ala Leu Glu Met Ala Asp Thr Phe Leu Asp Thr Met Arg  
 1 5 10 15  
  
 Val Gly Pro Arg Thr Tyr Ala Asp Val Arg Asp Glu Ile Asn Lys Arg  
 20 25 30  
  
 Gly Arg Glu Asp Arg Glu Ala Ala Arg Thr Ala Val His Asp Pro Glu  
 35 40 45  
  
 Arg Pro Leu Leu Arg Ser Pro Gly Leu Leu Pro Glu Ile Ala Pro Asn  
 50 55 60

36/38

Ala Ser Leu Gly Val Ala His Arg Arg Thr Gly Gly Thr Val Thr Asp  
 65 70 75 80

Ser Pro Arg Asn Pro Val Thr Arg  
 85

<210> 53  
 <211> 549  
 <212> DNA  
 <213> Human cytomegalovirus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (549)  
 <223>

<400> 53  
 atg gat ctc ttg att cgt ctc ggt ttt ctg ttg atg tgt gcg ttg ccg 48  
 Met Asp Leu Leu Ile Arg Leu Gly Phe Leu Leu Met Cys Ala Leu Pro  
 1 5 10 15  
 acc ccc ggt gag cgg tct tcg cgt gac ccg aaa acc ctt ctc tct ctg 96  
 Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Arg Asp Pro Lys Thr Leu Leu Ser Leu  
 20 25 30  
 tct ccg cga caa caa gct tgt gtt ccg aga acg aag tcg cac aga ccc 144  
 Ser Pro Arg Gln Gln Ala Cys Val Pro Arg Thr Lys Ser His Arg Pro  
 35 40 45  
 gtt tgt tac aac gat aca ggg gac tgc aca gat gca gat gat agc tgg 192  
 Val Cys Tyr Asn Asp Thr Gly Asp Cys Thr Asp Ala Asp Asp Ser Trp  
 50 55 60  
 aaa cag ctg ggt gag gac ttt gcg cac caa tgc ttg cag gcg gcg aaa 240  
 Lys Gln Leu Gly Glu Asp Phe Ala His Gln Cys Leu Gln Ala Ala Lys  
 65 70 75 80  
 aag agg cct aaa acg cac aaa tcc cgt ccg aac gat agg aac ctt gag 288  
 Lys Arg Pro Lys Thr His Lys Ser Arg Pro Asn Asp Arg Asn Leu Glu  
 85 90 95  
 ggt agg ctg acc tgt caa cga gtc cgt cgg cta ctg ccc tgt gat ttg 336  
 Gly Arg Leu Thr Cys Gln Arg Val Arg Arg Leu Leu Pro Cys Asp Leu

37/38

100	105	110	
gat att cat cct agc cac cgg ttg tta acg ctt atg aat aac tgc gtc			384
Asp Ile His Pro Ser His Arg Leu Leu Thr Leu Met Asn Asn Cys Val			
115	120	125	
tgt gac ggg gcc gtt tgg aac gcg ttt cgc ttg ata gaa cga cac gga			432
Cys Asp Gly Ala Val Trp Asn Ala Phe Arg Leu Ile Glu Arg His Gly			
130	135	140	
ttc ttc gct gtg act ttg tat tta tgt tgc ggg att act ctg ctg gtt			480
Phe Phe Ala Val Thr Leu Tyr Leu Cys Cys Gly Ile Thr Leu Leu Val			
145	150	155	160
gtt att cta gca ttg ctg tgc agc ata aca tac gaa tcg act gga cgt			528
Val Ile Leu Ala Leu Leu Cys Ser Ile Thr Tyr Glu Ser Thr Gly Arg			
165	170	175	
ggg att cga cgt tgt ggc tcc			549
Gly Ile Arg Arg Cys Gly Ser			
180			

<210> 54  
 <211> 183  
 <212> PRT  
 <213> Human cytomegalovirus

<400> 54

Met Asp Leu Leu Ile Arg Leu Gly Phe Leu Leu Met Cys Ala Leu Pro			
1	5	10	15
Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Arg Asp Pro Lys Thr Leu Leu Ser Leu			
20	25	30	
Ser Pro Arg Gln Gln Ala Cys Val Pro Arg Thr Lys Ser His Arg Pro			
35	40	45	
Val Cys Tyr Asn Asp Thr Gly Asp Cys Thr Asp Ala Asp Asp Ser Trp			
50	55	60	
Lys Gln Leu Gly Glu Asp Phe Ala His Gln Cys Leu Gln Ala Ala Lys			
65	70	75	80

Lys Arg Pro Lys Thr His Lys Ser Arg Pro Asn Asp Arg Asn Leu Glu  
85 90 95

Gly Arg Leu Thr Cys Gln Arg Val Arg Arg Leu Leu Pro Cys Asp Leu  
100 105 110

Asp Ile His Pro Ser His Arg Leu Leu Thr Leu Met Asn Asn Cys Val  
115 120 125

Cys Asp Gly Ala Val Trp Asn Ala Phe Arg Leu Ile Glu Arg His Gly  
130 135 140

Phe Phe Ala Val Thr Leu Tyr Leu Cys Cys Gly Ile Thr Leu Leu Val  
145 150 155 160

Val Ile Leu Ala Leu Leu Cys Ser Ile Thr Tyr Glu Ser Thr Gly Arg  
165 170 175

Gly Ile Arg Arg Cys Gly Ser  
180



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12595

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, C12N5/00, C07K14/74, C07K19/00, C12P21/02,  
A61K48/00, A61K38/00, A61K45/00, A61P31/00, A61P35/00,  
A61P37/04, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, C12N5/00, C07K14/74, C07K19/00, C12P21/02,  
A61K48/00, A61K38/00, A61K45/00, A61P31/00, A61P35/00,  
A61P37/04, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Tafuro S. et al., "Reconstitution of antigen presentation in HLA class I-negative cancer cells with peptide-beta2m fusion molecules", Eur.J. Immunol., 2001, February, Vol.31, No.2, pages 440 to 449; particularly, page 441, left column; Par. Nos. [0002] to [0007]; Figs. 1 to 5, "Discussion"	1-9
Y	Hengel, H. et al., "A viral ER-resident glyco protein inactivates the MHC-encoded peptide transporter", Immunity, 1997, Vol.6, pages 623 to 632, abstract; Fig. 1	1-9
Y	Frueh, K. et al., "A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation", Nature, 1995, Vol.375, pages 415 to 418; abstract; Figs. 1, 2	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
18 November, 2003 (18.11.03)

Date of mailing of the international search report  
02 December, 2003 (02.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12595

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hill, A. et al., "Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity", Nature, 1995, Vol.375, pages 411 to 415; abstract	1-9
Y	WO 98/47914 A2 (BOEHRINGER MANNHEIM G.M.B.H.), 29 October, 1998 (29.10.98), Abstract & AU 9875262 A1	1-9
Y	Mottez, E. et al., "Cells expressing a major histocompatibility complex class molecule with a single covalently bound peptide are highly immunogenic", J.Exp.Med., 1995, Vol.181, pages 493 to 502; Full text	1-9
Y	Langlade-Demoyen, P. et al., "Primary cytotoxic T lymphocyte induction using peptide-stripped autologous cells", International Immunology, 1994, Vol.6, No.11, pages 1759 to 1766, Figs. 1 to 4; abstract	1-9
Y	WO 01/18223 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 15 March, 2001 (15.03.01), Claims; abstract & AU 2000068720 A & EP 1211318 A1 & KR 2002013565 A	1-9
Y	Ramani, K. et al., "Site-specific gene-delivery in vivo through engineered Sendai viral envelopes", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1998, Vol.95, pages 11886 to 11890; abstract	1-9
Y	WO 01/57204 A1 (KANEDA, Yasufumi), 09 August, 2001 (09.08.01), Abstract & JP 2001-286282 A & EP 1170363 A1	1-9
Y	WO 94/24290 A1 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LTD.), 27 October, 1994 (27.10.94), Claims; examples & AU 9464353 A1 & EP 693125 A1 & US 2002/123108 A1	1-9
A	Johnson, D.R. et al., "Dependence of elevated human leukocyte antigen class I molecule expression on increased heavy chain, light chain ( $\beta$ 2-microglobulin), transporter associated with antigen processing, tapasin, and peptide", J.Biol.Chem., 2000, Vol.275, No.22, pages 16643 to 16649; abstract	1-9
P,X	WO 03/029475 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 10 April, 2003 (10.04.03), Claims (Family: none)	1-9

## A. 発明の属する分野 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, C12N5/00, C07K14/74, C07K19/00,  
C12P21/02, A61K48/00, A61K38/00, A61K45/00,  
A61P31/00, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, C12N5/00, C07K14/74, C07K19/00,  
C12P21/02, A61K48/00, A61K38/00, A61K45/00,  
A61P31/00, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Tafuro S. et al., "Reconstitution of antigen presentation in HLA class I-negative cancer cells with peptide-beta2m fusion molecules" Eur. J. Immunol., 2001 Feb., Vol.31, No.2, pp.440-449, 特にp.441左欄第2-7段落, Fig.1-5及び"Discussion"参照	1-9
Y	Hengel, H. et al., "A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter" Immunity, 1997, Vol.6, pp.623-632, 要約及びFig.1参照	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 11. 03

国際調査報告の発送日

02.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4 B 9 6 3 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると思われる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Frueh, K. et al., "A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation" Nature, 1995, Vol. 375, pp. 415-418, 要約及びFig. 1, 2参照	1-9
Y	Hill, A. et al., "Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity" Nature, 1995, Vol. 375, pp. 411-415, 要約参照	1-9
Y	WO 98/47914 A2 (BOEHRINGER MANNHEIM G. M. B. H.), 1998. 10. 29, 要約参照 & AU 9875262 A1	1-9
Y	Mottez, E. et al., "Cells expressing a major histocompatibility complex class I molecule with a single covalently bound peptide are highly immunogenic" J. Exp. Med., 1995, Vol. 181, pp. 493-502, 全文参照	1-9
Y	Langlade-Demoyen, P. et al., "Primary cytotoxic T lymphocyte induction using peptide-stripped autologous cells" International Immunology, 1994, Vol. 6, No. 11, pp. 1759-1766, Fig. 1-4及び要約参照	1-9
Y	WO 01/18223 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 2001. 03. 15, 請求の範囲, 要約参照 & AU 2000068720 A & EP 1211318 A1 & KR 2002013565 A	1-9
Y	Ramani, K., et al.; "Site-specific gene-delivery <i>in vivo</i> through engineered Sendai viral envelopes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol. 95, pp. 11886-11890, 要約参照	1-9
Y	WO 01/57204 A1 (KANEDA, Yasufumi), 2001. 08. 09, 要約参照 & JP 2001-286282 A & EP 1170363 A1	1-9
Y	WO 94/24290 A1 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LTD.), 1994. 10. 27, 請求の範囲及び各実施例参照 & AU 9464353 A1 & EP 693125 A1 & US 2002/123108 A1	1-9
A	Johnson, D.R. et al., "Dependence of elevated human leukocyte antigen class I molecule expression on increased heavy chain, light chain ( $\beta$ 2-microglobulin), transporter associated with antigen processing, tapasin, and peptide" J. Biol. Chem., 2000, Vol. 275, No. 22, pp. 16643-16649, 要約参照	1-9
PX	WO 03/029475 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 2003. 04. 10, 請求の範囲参照 (ファミリーなし)	1-9

## DESCRIPTION

METHODS FOR ENHANCING EXOGENOUS EPITOPE DISPLAY ON MHC CLASS I  
THROUGH INHIBITION OF TAP ACTIVITY

5

Technical Field

This invention relates to methods for enhancing exogenous epitope display on an MHC class I molecule through inhibition of TAP activity.

10 Background Art

The MHC (major histocompatibility complex) class I molecule is a heterodimer consisting of a heavy chain (HC) and  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2m), that is present on the cell membrane surface of almost every cell. The MHC class I molecule comprises a groove formed by the heavy chain that can stow a peptide of around 10 amino acids. The resulting MHC class I/peptide complex is recognized through T cell receptors (TCR) on cytotoxic T lymphocytes (CTL) that play a role in cellular immunity. Thus, a peptide displayed on an MHC class I molecule is called an "epitope" (antigenic determinant).

Peptide fragments derived from autoantigens produced in the cytoplasm, virus antigens, and tumor antigens are transported into the rough endoplasmic reticulum via a transporter called TAP (transporter associated with antigen processing) that exists on the surface of the rough endoplasmic reticulum. There they form stable MHC class I/peptide complexes with an MHC class I heavy chain and  $\beta$ 2m. The  $\beta$ 2-microglobulin molecule plays a role in retaining the stability of the 3-dimensional structure of the MHC class I molecule and in the transportation of the heavy chain to the cell surface (Tasuku Honjo and Takeshi Watanabe (ed.), "Immune System: Recognition, differentiation, and proliferation", The Molecular Biology Society of Japan (ed.), Maruzen Co., Ltd., Tokyo: p117-118). An empty MHC class I molecule unbound to a peptide is known to be very unstable under a culture condition of 37°C.

An epitope, *i.e.*, a peptide displayed on an MHC class I molecule, is a very important molecule in inducing specific cellular immunity against a certain antigen. They are integral in the development of peptide vaccines as immunotherapeutic agents against infections with viruses, such as HIV, or against cancers. However, peptides of major epitopes derived from many virus antigens and tumor antigens have weak binding activity to MHC class I molecules. Therefore, generally, when these peptides are used alone as vaccines, no effect can be expected due to their low stability. To date, an artificial epitope having amino acid substitutions to enhance the binding ability to MHC class I molecule without losing its antigenicity has been effectively used in a clinical study with melanoma patients. However, identification and development of such

epitopes with improved stability and antigenicity are troublesome and difficult and do not always result in an epitope of interest.

On the other hand, a system using the adjuvant effect of  $\beta$ 2m is under development based on the finding that the stability of a peptide on an MHC class I molecule is enhanced by  $\beta$ 2m.

5 Recently, the expression of MHC class I/peptide complexes wherein epitope peptides are fused with MHC class I molecules and MHC class II molecules or  $\beta$ 2m has been attempted (Uger, R. A. and Barber, B. H., J. Immunol. 160: 1598-1605 (1998); White, J. *et al.*, J. Immunol. 162: 2671-2676 (1999); Kang, X. *et al.*, Cancer Res. 57: 202-205 (1997); Uger, R. A. *et al.*, J. Immunol. 162: 6024-6028 (1999); USP No. 5,869,270). These complexes are reported to exhibit enhanced  
10 stability and recognition by CTL as compared to the peptides alone, in particular, those constructed with epitopes having weak binding activity to MHC class I molecules, by the fusion of the epitope peptide sequence via a linker to the N-terminus of  $\beta$ 2m (epitope-linked- $\beta$ 2m; e/ $\beta$ 2m).

At present, the MHC class I/peptide complexes that comprise human MHC class I molecules are prepared by the independent expression and purification of heavy chains (HC) and  
15  $\beta$ 2m proteins in *E. coli*, followed by *in vitro* folding of these molecules with a synthetic peptide. In contrast, in relation with mouse MHC class I molecules, construction of an insect cell-derived MHC class I/peptide complex using a baculovirus vector has been reported (White, J. *et al.*, J. Immunol. 162: 2671-2676 (1999)). In this system, the MHC class I/peptide complex is constructed in cells co-infected with baculoviruses expressing a heavy chain of MHC class I and  
20 an epitope-linked- $\beta$ 2m, respectively. Since the baculovirus vector system expresses exogenous genes located downstream of a promoter effective in insect cells (for example, Sf9 cells), it is difficult to apply this system to mammalian cells (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-502990). In addition, while Punnonen *et al.* have disclosed a genetic vaccine vector for use in DNA shuffling (Punnonen, J. *et al.*, Genetic Vaccine Vector Engineering,  
25 USP Application Serial No. 20010006950), an epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta$ 2m has not yet been described.

#### Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide methods for enhancing an exogenous  
30 epitope display on an MHC class I molecule through inhibition of TAP activity.

The present inventors constructed a gene encoding epitope-linked- $\beta$ 2m utilizing recombinant DNA technology, to express the epitope-linked- $\beta$ 2m molecule in mammalian cells using a mammalian cell-infecting virus vector, and to develop a system for producing MHC class I/peptide complexes in these cells. However, since there are many MHC class I molecules on the  
35 surface of mammalian cells and respective MHC class I molecules display a variety of peptides derived from proteins present intracellularly, available levels of MHC class I molecules necessary

to form a complex with epitope-linked- $\beta$ 2m will decrease depending on the peptide levels, when the epitope-linked- $\beta$ 2m is expressed in mammalian cells.

The present inventors thought that to enhance frequency of MHC class I molecules on which an epitope of interest was displayed was very important for the induction of immunity. For example, for the quantification of frequency of antigen-specific CTL using an MHC class I/peptide complex, a method utilizing an "MHC class I/peptide tetrameric complex (tetramer)" has been developed (Altman J. D. *et al.*, Science 274: 94-96 (1996)). This tetramer is prepared by tetramerization of a monomeric MHC class I/peptide complex using the biotin-avidin binding system followed by the addition of a fluorescence label and is used for FACS analysis. Since this method allows for direct analysis of peripheral blood mononuclear cell samples isolated from individuals, it is not only simple and reflects directly the frequency in each individual, but it also has high sensitivity and high specificity (Wilson, J.D.K. *et al.*, J. Exp. Med. 188: 785-790 (1998); Kuroda, M.J. *et al.*, J. Exp. Med. 187: 1373-1381 (1998)). The present inventors paid attention to the details that, in the analysis of above MHC class I/peptide complex, while the initially attempted FACS analysis failed due to a weak binding of the monomeric MHC class I/peptide complex to TCR at a ratio of 1:1, tetramerization of the monomeric MHC class I/peptide complex, that is, presence of multiple binding of MHC class I/peptide complex to TCR simultaneously, made it possible for the first time to analyze the complex.

Also, in the above-described epitope-linked- $\beta$ 2m expression system in mammalian cells, it is likely that probability of the presence of the MHC class I/peptide complex displaying an epitope of interest in the neighborhood will decline, when a variety of peptides derived from intracellular proteins are being displayed.

Taking the above two points into consideration, the present inventors speculated that if one kind of epitope could be displayed efficiently on MHC class I/peptide complex located on a cell membrane surface, it would also be recognized by TCR efficiently, that is, CTL could be activated efficiently. Until now, for example, it has been reported that CTL can be activated efficiently by adding a synthetic single peptide at a high concentration to a cell surface that was previously treated with an acid followed by washing out to remove the peptide displayed on the MHC class I/peptide complex (Langlade-Demoyen, P. *et al.*, Int. Immunol. 6: 1759-1766 (1994)). However, while such manipulation can be done *in vitro*, practically, it is impossible in individuals. Moreover, it is difficult to apply such manipulation to immunotherapy, particularly when one takes the low stability of the peptide as described above into consideration.

Accordingly, the present inventors intended to present the epitope of interest alone fused with  $\beta$ 2m as an antigen, by inhibiting the cell-derived antigen presentation using a molecule that inhibits the TAP-mediated peptide transportation. First of all, recombinant Sendai virus (SeV) vectors that express ICP47 (Hill, A. *et al.*, Nature 375: 411-415 (1995); Fruh, K. *et al.*, Nature 375:

415-418 (1995)) derived from type I herpes simplex virus (HSV-1) and US6 (Ahn, K. *et al.*, Immunity 6: 613-621 (1997); Hengel, H. *et al.*, Immunity 6: 623-632 (1997)) from human cytomegalovirus (CMV) which are known as TAP-inhibiting factors, were constructed. These vectors were introduced into a human CD4-positive T lymphocyte cell line H9 and MT-2 cells, and then the MHC class I/peptide complexes on the cell surface were analyzed by flow cytometry. As a result, while a significant change in the MHC class I/peptide complex levels was not detected in cells infected with wild type SeV as control cells, the MHC class I/peptide complex levels decreased with time in cells infected with the SeV vector expressing the TAP-inhibitory molecule US6, indicating that the expression of new (*de novo*) MHC class I/peptide complexes was suppressed.

Next, after the infection of the above cells with the SeV vector expressing either ICP47 or US6, epitopes expressed on the cell surface were dissociated by a further acid treatment of the cells. This treatment was capable of efficiently reducing the levels of the MHC class I/peptide complexes originally existing on the cell surface. Furthermore, the present inventors carried out an experiment to express in high levels the MHC class I/peptide complex having a single epitope on the cell surface by simultaneously expressing in the cells TAP-inhibitory molecule and an epitope-linked- $\beta$ 2m. For this purpose, the present inventors constructed a vector that co-expresses both a TAP-inhibitory molecule (US6) and an epitope-linked- $\beta$ 2m. The epitope expressed by the vector can exist irrelevant to TAP in the rough endoplasmic reticulum, since it is fused with  $\beta$ 2m. Using this vector, by reducing MHC class I/peptide complexes displaying endogenous protein-derived peptides by the effect of the TAP-inhibitory factor, the present inventors succeeded in expressing at high frequency the MHC class I/peptide complex containing an exogenous epitope of interest bound to  $\beta$ 2m. Thus, the present invention provides for the first time a novel concept that uses the TAP-inhibitory molecule for "an expression system for an MHC class I/peptide complex having a single peptide in high frequency on the cell surface", which is expected to be used as a vaccine for immunotherapy.

The present invention makes it possible to express an MHC class I/peptide complex containing an epitope-linked- $\beta$ 2m of interest in high purity in mammalian cells. For example, by introducing into cells a mammalian cell-infectious virus vector that expresses  $\beta$ 2m or an MHC class I heavy chain bound to an epitope and expressing it in the presence of a TAP inhibitor as shown in Examples, it is possible to form preferentially on the cell surface an MHC class I/peptide complex containing the epitope expressed by the introduced gene.

As shown in Examples, cells co-expressing an epitope-linked- $\beta$ 2m (*e.g.*,  $\beta$ 2m bound with an epitope derived from the HIV-1 Nef protein) and the MHC class I heavy chain (HLA-A\*2402) are recognized by antigen-specific CTL equivalently or more efficiently as compared to cells pulsed with a synthetic epitope peptide derived from the HIV-1 Nef protein. Also, the



epitope-linked- $\beta$ 2m recovered from cells into which the SeV vector expressing the epitope-linked- $\beta$ 2m has been introduced induces an antigen specific CTL reaction against target cells by adding the epitope-linked- $\beta$ 2m to a culture solution of the target cells. These findings indicate that a vector encoding epitope-linked- $\beta$ 2m is useful for gene therapy *in vivo* or *ex vivo* to induce antigen-specific immune responses. Use of TAP inhibitors in this system makes it possible to display the epitope of interest in higher purity. It may be possible to realize an extremely effective immunotherapy by producing the MHC class I/peptide complex of interest in individuals in the presence of the TAP-inhibitory protein.

Thus, the present inventors established methods for the efficient display of an exogenous epitope by inhibiting the display of endogenous epitopes through the inhibition of TAP. *In vivo* or *ex vivo* introduction of a vector expressing an MHC class I heavy chain or  $\beta$ 2m fused with an epitope in the presence of the TAP inhibitor makes it possible to induce antigen-specific cellular immunity. The methods of the present invention, for example, may be useful for the induction of protective immunity against infectious diseases caused by infection with viruses or bacteria, and for immunotherapy against cancers.

Namely, the present invention relates to methods for enhancing exogenous epitope display on MHC class I molecules through inhibition of TAP activity, more specifically to:

(1) a method for enhancing exogenous epitope display on an MHC class I molecule, wherein said method comprises the steps of:

- (a) inhibiting TAP activity in a cell; and
- (b) expressing an epitope-fused MHC class I heavy chain or an epitope-fused  $\beta$ 2m in said cell;
- (2) the method of (1), wherein said method further comprises the step of acid treatment;
- (3) the method of (1) or (2), wherein said step of inhibiting TAP activity in a cell comprises the step of contacting said cell with a protein having TAP inhibitory activity, or the step of introducing a vector encoding said protein into said cell;
- (4) the method of (3), wherein said protein having said TAP inhibitory activity is US6 or ICP47;
- (5) the method of (3), wherein said vector is a mammalian cell-infecting virus vector;
- (6) the method of (5), wherein said vector is a Sendai virus vector;
- (7) a mammalian cell, wherein (i) expression of a TAP gene in said cell has been inhibited, said cell comprises a TAP inhibitor, or said cell bears a gene encoding said TAP inhibitor in an expressible way, and wherein (ii) said cell bears a gene encoding an epitope-fused MHC class I heavy chain or an epitope-fused- $\beta$ 2m in an expressible way;
- (8) a kit for displaying an epitope comprising: (i) a TAP inhibitor or a vector capable of expressing said inhibitor; and (ii) an epitope-fused MHC class I heavy chain or an epitope-fused  $\beta$ 2m, or a vector capable of expressing said epitope-fused MHC class I heavy chain or said epitope-fused  $\beta$ 2m; and

(9) a vector capable of expressing both (i) and (ii):

(i) a TAP inhibitor; and

(ii) an epitope-fused MHC class I heavy chain or an epitope-fused  $\beta$ 2m.

5                   The present invention provides methods for enhancing exogenous epitope display on an MHC class I molecule through inhibition of TAP activity. Specifically, the methods of the present invention comprise the steps of: (a) inhibiting a cellular TAP activity, and (b) expressing an MHC class I heavy chain fused with an epitope or  $\beta$ 2m fused with the epitope in the cells. There is no restriction on the order of the steps (a) and (b), and the above-described  
10 methods include the practical order of performing step (a) then step (b), step (b) then (a), and performing steps (a) and (b) simultaneously. TAP is a molecule that belongs to the ATP-binding cassette family, which includes two types, TAP-1 and TAP-2.

The human TAP-1 gene is described, for example, in Accession NM\_000593 (SEQ ID NO: 47) (protein ID NP\_000584 (SEQ ID NO: 48)) (Garbi, N. *et al.*, Eur. J. Immunol. 33: 264-273  
15 (2003); Heintke, S. *et al.*, FEBS Lett. 533: 42-46 (2003); Ozbas-Gerceker, F. *et al.*, Turk J Pediatr 44: 91-97 (2002); Seliger, B. *et al.*, Int. J. Oncol. 20: 349-353 (2002); Saveanu, L. and Van Endert, P.M., Adv. Exp. Med. Biol. 495: 79-82 (2001); Chen, H.L. *et al.*, Nat. Genet. 13: 210-213 (1996); Beck, S. *et al.*, J. Mol. Biol. 255: 1-13 (1996); Jackson, D.G and Capra, J.D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 11079-11083 (1993); Glynn, R. *et al.*, Eur. J. Immunol. 23: 860-866 (1993); Beck, S.  
20 *et al.*, J. Mol. Biol. 228: 433-441 (1992); Bodmer, J.G *et al.*, Tissue Antigens 39: 161-173 (1992); Bahram, S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 10094-10098 (1991); Spies, T. *et al.*, Nature 348: 744-747 (1990); Trowsdale, J. *et al.*, Nature 348 (6303): 741-744 (1990)). TAP-1 is also called APT1, PSF1, ABC17, ABCB2, RING4, or D6S114E. In addition, the rat TAP-1 gene is described, for example, in Accession NM\_032055 (protein ID NP\_114444) (Rudolph, M.G. *et al.*,  
25 J. Mol. Biol. 324: 975-990 (2002); Daumke, O. and Knittler, M.R., Eur. J. Biochem. 268: 4776-4786 (2001); Deverson, E.V. *et al.*, Nature 348: 738-741 (1990)). The mouse TAP-1 gene is described in Accession NM\_013683 (protein ID NP\_038711) (Garbi, N. *et al.*, Eur. J. Immunol. 33: 264-273 (2003); Ruedl, C. *et al.*, Eur. J. Immunol. 32: 818-825 (2002); Neveu, R. *et al.*, Mol. Immunol. 38: 661-667 (2002); Marusina, K. *et al.*, J. Immunol. 158: 5251-5256 (1997); Van Kaer,  
30 L. *et al.*, Cell 71: 1205-1214 (1992); Hanson, I.M. and Trowsdale, J., Immunogenetics 34: 5-11 (1991); Cho, S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 5197-5201 (1991); Monaco, J.J. *et al.*, Science 250 (4988): 1723-1726 (1990)).

The human TAP-2 gene is described, for example, in Accession NM\_000544 (SEQ ID NO: 49) (protein ID NP\_000535 (SEQ ID NO: 50) (Garbi, N. *et al.*, Eur. J. Immunol. 33: 264-273  
35 (2003); Heintke, S. *et al.*, FEBS Lett. 533: 42-46 (2003); Ozbas-Gerceker, F. *et al.*, Turk J Pediatr 44: 91-97 (2002); Penformis, A. *et al.*, Hum. Immunol. 63: 61-70 (2002); Saveanu, L. and Van

Endert, P.M., *Adv. Exp. Med. Biol.* 495: 79-82 (2001); Yan, G. *et al.*, *J. Immunol.* 162: 852-859 (1999); Cesari, M.M. *et al.*, *Immunogenetics* 45: 280-281 (1997); Pattanakitsakul, S. *et al.*, *Tissue Antigens* 47: 353-355 (1996); Beck, S. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 255: 1-13 (1996); Cano, P. and Baxter-Lowe, L.A., *Tissue Antigens* 45: 139-142 (1995); de la Salle, H. *et al.*, *Science* 265: 237-241 (1994); Glynn, R. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 23: 860-866 (1993); Powis, S.H. *et al.*, *Immunogenetics* 37: 373-380 (1993); Beck, S. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 228: 433-441 (1992); Bodmer, J.G. *et al.*, *Tissue Antigens* 39: 161-173 (1992); Powis, S.H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 1463-1467 (1992); Kelly, A. *et al.*, *Nature* 355: 641-644 (1992); Bahram, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 10094-10098 (1991); Trowsdale, J. *et al.*, *Nature* 348 (6303): 741-744 (1990)). TAP-2 is also called APT2, PSF2, ABC18, ABCB3, RING11, or D6S217E. In addition, the mouse TAP-1 gene is described, for example, in Accession NM\_011530 (protein ID NP\_035660, P36371) (Garbi, N. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 33: 264-273 (2003); Marusina, K. *et al.*, *J. Immunol.* 158: 5251-5256 (1997); Yang, Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 11669-11672 (1992); Attaya, M. *et al.*, *Nature* 355: 647-649 (1992); Monaco, J.J. *et al.*, *Science* 250: 1723-1726 (1990)). The rat TAP-1 gene is described, for example, in Accession NM\_032056 (protein ID NP\_114445) (Powis, S.J. *et al.*, *Nature* 354: 528-531 (1991)). The bovine TAP-1 gene is described, for example, in Accession NM\_174222 (protein ID NP\_776647) (Ambagala, A.P. *et al.*, *Immunogenetics* 54: 30-38 (2002)).

The TAP-1 and TAP-2 genes exhibit polymorphisms. In the present invention, reference to the TAP-1 and TAP-2 genes encompasses all types of respective polymorphisms. Specifically, in the present invention, the TAP-1 and TAP-2 genes respectively include nucleic acids encoding proteins comprising amino acid sequences having 68% or more, preferably 70% or more, more preferably 75% or more, more preferably 80% or more, more preferably 85% or more, more preferably 90% or more, and more preferably 95% or more identity to above-mentioned mammalian TAP-1 (such as NP\_000584, NP\_114444, or NP\_038711) and TAP-2 (such as NP\_000535, NP\_035660, P36371, NP\_114445, or NP\_776647) proteins. These proteins are involved in the processing of epitopes.

Amino acid sequence identity can be determined using, for example, the BLASTP program (Altschul, S. F. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)). For example, a search may be carried out in the BLAST web page of NCBI (National Center for Biotechnology Information) using default values as parameters without use of any filters including Low complexity (Altschul, S.F. *et al.*, *Nature Genet.* 3: 266-272 (1993); Madden, T.L. *et al.*, *Meth. Enzymol.* 266: 131-141 (1996); Altschul, S.F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997); Zhang, J. & Madden, T.L., *Genome Res.* 7: 649-656 (1997)). For example, using the blast2sequences program (Tatiana A *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.* 174: 247-250 (1999)) for the comparison of two sequences, an alignment of the two sequences can be prepared to determine the sequence identity. For example,

the identity value for the total amino acid sequences of the mammalian TAP-1 (such as NP\_000584, NP\_114444, or NP\_038711) and TAP-2 (such as NP\_000535, NP\_035660, P36371, NP\_114445, or NP\_776647) proteins can be calculated by equating gaps with mismatches.

In addition, in the present invention, the TAP-1 and TAP-2 genes respectively include  
 5 nucleic acids hybridizable to 30 nucleotides or more, more preferably 50 nucleotides or more, more preferably 100 nucleotides or more, more preferably 150 nucleotides or more, and more preferably the full-length of the protein-encoding sequences in the above-mentioned mammalian TAP-1 (such as NM\_000593, NM\_032055, or NM\_013683) and TAP-2 (such as NM\_000544, NM\_011530, NM\_032056, or NM\_174222) genes under the stringent conditions. In the  
 10 hybridization, such nucleic acids may be identified by preparing a probe either from a nucleic acid containing a coding sequence of a mammalian TAP-1 or TAP-2 gene or from a nucleic acid of a hybridization target, and then detecting the probe hybridized to the corresponding nucleic acid. The stringent hybridization conditions include, for example, hybridization in a solution containing 5x SSC (1x SSC contains 150 mM sodium chloride and 15 mM sodium citrate), 7% (w/v) SDS  
 15 (sodium dodecyl sulfate), 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA, 5x Denhardt's solution (1x Denhardt's solution contains 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% bovine serum albumin, and 0.2% Ficoll), at 48°C, preferably at 50°C, more preferably at 55°C, and more preferably at 60°C, followed by washing at the same temperature as that in hybridization in a solution containing 2x SSC and 0.1% (w/v) SDS, preferably 1x SSC and 0.1% (w/v) SDS, more preferably 0.5x SSC and  
 20 0.1% (w/v) SDS, and more preferably 0.1x SSC and 0.1% (w/v) SDS, for 2 hours with shaking.

Both TAP-1 and TAP-2 have transmembrane domains and function as transporters by forming heterodimers on the endoplasmic reticulum membrane. No antigen presentation on MHC class I molecule can be done without either one of the two. Peptides processed in the cytoplasm are transported into endoplasmic reticulum via the TAP transporter in an  
 25 ATP-dependent manner, and there bind to the MHC class I molecule. In the present invention, TAP includes TAP-1 and TAP-2. Also, inhibition of TAP activity includes inhibition of TAP-1 activity and/or the TAP-2 activity. The inhibition of TAP activity may be direct or indirect. For example, inhibition of TAP activity includes direct inhibition of TAP activity, by applying an inhibitor acting directly on TAP, and indirect inhibition of TAP activity, by suppressing the  
 30 expression of TAP (transcription or translation). Inhibition of TAP expression can be carried out by intracellularly expressing an antisense nucleic acid for the TAP gene, or by expressing a ribozyme that intracellularly cleaves transcripts of the TAP gene. Inhibition of the TAP gene expression can also be done by RNA interference (RNAi) using a nucleic acid having a double stranded RNA portion containing a complementary sequence of a portion of the TAP gene  
 35 transcripts. All of these may be used as TAP inhibitors in the present invention.

Generally, RNAi denotes a phenomenon that expression of the target gene is inhibited

through inducing the mRNA destruction of the target gene, by introducing into cells or expressing in cells RNA comprising a sense RNA having a sequence homologous to a portion of the mRNA sequence of the target gene and an antisense RNA having a sequence complementary to the sense RNA (Genes Dev. 15: 188-200 (2001); Elbashir, SM *et al.*, Nature 411: 494-498 (2001)). When a double stranded RNA having an RNAi effect is introduced into cells, an enzyme called DICER (a member of RNase III nuclease family) will contact with the double stranded RNA and the double stranded RNA will be degraded into a small fragment called a small interfering RNA (siRNA). In this invention, in addition to such RNA generated by the intracellular processing, RNA molecules artificially synthesized or expressed to inhibit the expression of the target gene through RNAi are also generically called siRNA. In the present invention, RNA having the RNAi effect include these siRNAs. Expression of the target gene can be suppressed *in vivo* via siRNA (Anton P. *et al.*, Nature Vol. 418: 38-39 (2002); David L. *et al.*, Nature genetics Vol. 32: 107-108 (2002)).

Generally, siRNA are RNA comprising a nucleotide sequence having 15 contiguous nucleotides or more (more preferably 16 nucleotides or more, 17 nucleotides or more, 18 nucleotides or more, or 19 nucleotides or more) within the transcribed sequence (mRNA sequence) of a certain target gene and its complementary sequence, which will form a double stranded RNA with each other by hybridization. Preferably, siRNA include a sequence of 19 to 30 contiguous nucleotides, more preferably 20 to 25 contiguous nucleotides, more preferably 21 to 23 contiguous nucleotides, or its complementary sequence in one strand, and opposite strand that forms a complementary pair with it. However, there is no limitation on RNA length because even RNA having a longer sequence can be expected to be endogenously degraded into siRNA having the RNAi effect. Also, it is possible to degrade beforehand a long chain double stranded RNA corresponding to entire or almost entire region of mRNA from the target gene with, for example, DICER and to use the degradation product as siRNA. This degradation product is expected to include an RNA molecule (siRNA) having the RNAi effect. There is no need to choose a region of mRNA expected to have the RNAi effect, according to this method. Namely, it is not always necessary to define exactly the sequence having the RNAi effect against the target gene.

It is known that a double stranded RNA having an overhang with a few nucleotides at the end generally has a high RNAi effect. It is desirable, but not essential, that siRNA used in the present invention have the overhang with a few nucleotides at the end (preferably at the 3' end). Though there is no limitation on length of the nucleotide sequence that forms the overhang, a 2 nucleotide overhang is preferred. In the present invention, for example, a double stranded RNA having an overhang with TT (two thymines), UU (two uracils), or other nucleotides (most preferred molecule has a 19 base paired double stranded RNA portion and a 2 nucleotides' (TT) overhang portion) may suitably be used. In the present invention, siRNA include such molecules having DNA that forms the overhang.

Also, two strands that form base pairs within the siRNA may be connected via a spacer sequence. Namely, a double stranded RNA generated by a loop formation of the spacer and annealing with each other of the remaining two sequences up and down wards from the loop may also be suitably used. Though there is no limitation on the spacer length, it may be 3 to 23 nucleotides, for example.

Moreover, vectors capable of expressing the above siRNA may also be used in the present invention. Namely, the present invention relates to use of a vector capable of expressing RNA having the RNAi effect. For example, the above vector may be a nucleic acid in which one strand of the double stranded siRNA and the other strand are linked to different promoters respectively, so that each strand is expressed separately. Optionally, alternative splicing may be used to transcribe the two kinds of RNA from one promoter. Optionally, the vector may express a single stranded RNA in which a sense strand and an antisense strand are linked via a spacer (that forms a loop). This RNA expressed from the vector suppresses expression of a target gene by forming an RNA stem having the RNAi effect. The stem length is similar to that of above siRNA, and it may be 19 to 29 nucleotides, for example. Though there is no limitation on the spacer length, it may be 3 to 23 nucleotides, for example. The 5' and/or 3' ends of the stem may or may not have an overhang of a few nucleotides. These vectors may be easily prepared using genetic engineering techniques generally known to those skilled in the art (Brummelkamp, T.R. *et al.*, Science 296: 550-553 (2002); Lee, N.S. *et al.*, Nature Biotechnology 19: 500-505 (2001); Miyagishi, M., and Taira, K., Nature Biotechnology 19: 497-500 (2002); Paddison, P.J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 1443-1448 (2002); Paul, C.P. *et al.*, Nature Biotechnology 19: 505-508 (2002); Sui, G. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99(8): 5515-5520 (2002); Proc Natl Acad Sci USA 99: 14943-14945 (2002); Paddison, P.J. *et al.*, Genes Dev. 16:948-958 (2002)). More specifically, it is possible to construct recombinant vectors by inserting DNA encoding the target RNA sequence into various kinds of known expression vectors appropriately. Preferred promoters include the RNA polymerase III promoter. Specifically, the U6 Pol III promoter, the H1 RNA promoter (H1 RNA is one component that constitutes RNase P), and the like, may be used, for example.

One preferred example of siRNA is described below; however, siRNA that can be used in the present invention are not limited thereto. First of all, a transcriptional region located at least 50 nucleotides, preferably 60 nucleotides, and more preferably 70 nucleotides downstream from the initiation codon of the target gene, is selected. Preferably, an AA sequence may be found there. Seventeen to 20 nucleotides following the AA sequence (for example, 19 nucleotides following AA) are then selected. There is no limitation on the nucleotide next to AA, but preferably G or C is selected. Herein, the GC content of the sequence to be selected is preferably 20 to 80%, more preferably 30 to 70%, and more preferably 35 to 65%. In addition, the selected sequence is preferably specific for a target gene among the genes expressed in tissues to which

siRNA is administered. For example, preferably, it is confirmed that there is no gene having the same transcriptional sequence except for the target gene among the genes present in individuals to which siRNA is to be administered, by searching public gene sequence databases using the selected sequence as a query. Also, the sequence is preferably selected from the protein coding sequence (CDS) of the target gene. Suitable siRNA may include sequences having these selected sequences without initial AA (preferably, UU or TT may be added at the 3'end) and their complementary sequences (preferably, UU or TT may be added at the 3'end). In a similar way to that described above, instead of searching the sequences following the AA sequence, sequences following a CA sequence may be searched. Alternatively, other sequences than AA or CA may also be searched. It may also be possible to appropriately select an RNA having the most suitable RNAi effect from a number of siRNAs thus prepared.

RNA having the RNAi effect can appropriately be prepared by those skilled in the art, based on the nucleotide sequence of a target gene. The nucleotide sequence of the target TAP gene can easily be obtained from a public gene database as described above, by the screening of a mammalian cDNA library using a known TAP gene as a probe, or by RT-PCR. Based on the obtained nucleotide sequence of the gene, siRNA may be designed according to the above description.

It is not always necessary to know the entire nucleotide sequence of the target gene. One need only know of a contiguous RNA region to be selectable as siRNA (for example, 20 to 30 nucleotides). Therefore, it is possible to prepare a siRNA even from a gene fragment such as an EST (Expressed Sequence Tag) for which the entire nucleotide sequence is not known but for a portion of mRNA, based on the nucleotide sequence of the gene fragment. When a synthesized siRNA is used clinically, it may be modified.

On the other hand, when antisense nucleic acids are used to suppress gene expression, they may comprise antisense sequences against 13 contiguous nucleotides or more, preferably 14 nucleotides or more, and more preferably 15 nucleotides or more (18 nucleotides or more, 20 nucleotides or more, or 25 nucleotides or more) within the transcriptional sequence of the target TAP gene. For example, preferred antisense nucleic acids include antisense sequences against an exon-intron boundary within an early transcriptional sequence, an intron-exon boundary, a region containing a translational initiation codon, an untranslated region around the 5'end, and a nucleotide sequence of 13 contiguous nucleotides or more, preferably 14 nucleotides or more, and more preferably 15 nucleotides or more within the protein coding region (CDS) of a mature mRNA. In addition, when antisense nucleic acids are to be used clinically, they generally comprise synthetic oligomers. Antisense nucleic acids may be DNA, and they may be modified. For example, it is generally known to use an S oligo (a phosphorothioate type oligonucleotide) in which the O (oxygen) atom of a phosphodiester bond is substituted with an S (sulfur) atom so as to

decrease in sensitivity to nuclease digestion yet maintain the activity as an antisense nucleic acid. Clinical studies of injection of this S oligo directly into an affected area as an antisense drug are in presently in progress. This S oligo is also suitable for use in the present invention. While the antisense nucleic acid sequence is preferably complementary to a target gene or its portion, it need

5 not necessarily be completely complementary, so long as it is capable of effectively suppressing gene expression. The transcribed RNA is preferably be 90% or more, most preferably 95% or more complementary to the target gene transcript. Chain length of antisense nucleic acid is preferably 17 nucleotides or more, more preferably 20 nucleotides or more, more preferably 25 nucleotides or more, more preferably 30 nucleotides or more, more preferably 40 nucleotides or

10 more, more preferably 50 nucleotides or more, and most preferably 100 nucleotides or more, for an effective suppression of a target gene expression. Antisense RNA can also be expressed intracellularly. Such can be done by constructing a vector connected with a nucleic acid encoding an RNA of interest downstream of a promoter effective in the target cells, and then introducing it into the cells.

15 As for vectors, virus vectors, including retrovirus vectors, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, minus strand RNA virus vectors, and non-viral vectors including liposomes, may be used. Using these vector systems or carriers for gene transfer, gene therapy may be performed by administering them to patients using an *ex vivo* method, an *in vivo* method, or the like.

20 Alternatively, one may suppress the TAP gene expression using a ribozyme, or a vector encoding the ribozyme. The term "ribozyme" refers to an RNA molecule having a catalytic activity. Since there is a variety of ribozymes having different activities, it may also be possible to design a ribozyme capable of site-specifically cleaving RNA. While ribozymes include those having 400 nucleotides or more in length, such as group I intron type RNAs and the M1 RNA

25 contained in RNase P, those having active domains with about 40 nucleotides in length, which are called hammerhead type (Rossi *et al.*, Pharmac. Ther. 50: 245-254 (1991)) or hair pin type (Hampel *et al.*, Nucl. Acids Res. 18: 299-304 (1990), and U.S. Pat. No. 5,254,678) ribozymes, are also known (Makoto Koizumi and Eiko Ohtsuka, Protein, Nucleic acid and Enzyme 35: 2191 (1990)).

30 For example, while the self-cleaving domain of the hammerhead type ribozymes cleaves the 3' side of C15 within the sequence G13U14C15, formation of a base pair between U14 and A9 is thought to be important for the activity, and it has been shown that the cleavage also occurred at the 3' side of A15 or U15 instead of C15 (Koizumi, M. *et al.*, FEBS Lett. 228: 228 (1988)). An restriction enzyme-like RNA-cleaving ribozyme that recognizes UC, UU, or UA sequence within

35 the target RNA may be constructed, when a ribozyme is designed in such a way that the substrate-binding site is complementary to an RNA sequence near the target site (Koizumi, M. *et*



*al.*, FEBS Lett. 239: 285 (1988); Makoto Koizumi and Eiko Ohtsuka, Protein, Nucleic acid and Enzyme 35: 2191 (1990); Koizumi, M. *et al.*, Nucl. Acids Res. 17: 7059 (1989)).

Also, a hairpin type ribozyme may be useful for the purpose of the present invention. This type of ribozyme is found, for example, in the minus strand of satellite RNA from tobacco ring spot virus (Buzayan, JM., Nature 323: 349 (1986)). It has been shown that a target-specific RNA cleaving ribozyme can also be constructed from the hairpin type ribozyme (Kikuchi, Y. & Sasaki, N., Nucl Acids Res. 19: 6751 (1991); Kikuchi, Y., Kagaku to Seibutu 30: 112 (1992)). Thus, expression of a target gene can be suppressed by specifically cleaving the transcript of the target gene using ribozymes.

Alternatively, to inhibit TAP activity, a mutation may be introduced into the TAP gene, or the TAP gene may be deleted by gene targeting. In the present invention, "inhibiting TAP activity" may also include providing or preparing a cell defective in the expression of the TAP gene. In the present invention, TAP inhibitors include such compounds that inhibit TAP activity directly or indirectly. Namely, TAP inhibitors include these antisense nucleic acids, ribozymes, siRNA, and further more, factors that suppress expression of the TAP gene. There is no limitation on the TAP inhibitors so long as they have the TAP-inhibitory activity; they include proteins, peptide compounds, non-peptide compounds, nucleic acids, nucleic acid analogues, and low molecular compounds.

When a TAP inhibitor can be encoded by a nucleic acid, it may be expressed by introducing a vector that expresses the nucleic acid into cells. Examples of TAP-inhibitory proteins include ICP47 derived from herpes simplex virus (Hill, A. *et al.*, Nature 375: 411-415 (1995); Fruh, K. *et al.*, Nature 375: 415-418 (1995)) and US6 derived from cytomegalovirus (Ahn, K. *et al.*, Immunity 6: 613-621 (1997); Hengel, H. *et al.*, Immunity 6: 623-632 (1997)).

Specifically, ICP47 from Human herpes virus type I is referenced in Accession NC\_001806 (complementary strand of 145311-145577) (SEQ ID NO: 51) (protein ID NP\_044675, P03170 (SEQ ID NO: 52)) (Dolan, A. *et al.*, J. Gen. Virol. 73 (Pt 4): 971-973 (1992); Perry, L.J. and McGeoch, D.J.; J. Gen. Virol. 69 (Pt 11): 2831-2846 (1988); McGeoch, D.J. *et al.*, J. Gen. Virol. 69 (Pt 7): 1531-1574 (1988); McGeoch, D.J. *et al.*, Nucleic Acids Res. 14 (4): 1727-1745 (1986); McGeoch, D.J. *et al.*, J. Mol. Biol. 181 (1): 1-13 (1985)). In addition, ICP47 from Human herpes virus type 2 is referenced in Accession NC\_001798 (complementary strand of 147775-148035) (protein ID NP\_044543) (Barnett, B.C. *et al.*, J. Gen. Virol. 73 (Pt 8): 2167-2171 (1992); McGeoch, D.J. *et al.*, J. Gen. Virol. 72 (Pt 12): 3057-3075 (1991); Everett, R.D. and Fenwick, M.L., J. Gen. Virol. 71 (Pt 6): 1387-1390 (1990); McGeoch, D.J. *et al.*, J. Gen. Virol. 68 (Pt 1): 19-38 (1987)).

For US6 from cytomegalovirus, for example, US6 from human CMV is referenced, in Accession AY072775 (SEQ ID NO: 53) (protein ID AAL67143 (SEQ ID NO: 54), NP\_040091),

and US6 from chimpanzee CMV is referenced in Accession NC\_003521 (protein ID NP\_612779) (Davison, A.J. *et al.*, J. Gen. Virol. 84 (Pt 1): 17-28 (2003)).

The ICP47 molecule inhibits TAP-mediated peptide transport by binding to the peptide-binding site of the TAP molecule (Tomazin, R. *et al.*, EMBO J. 15: 3256-3266 (1996)).

5 On the other hand, the US6 molecule inhibits binding of ATP to TAP-1, which leads to inhibition in peptide transport (Hewitt, E. *et al.*, EMBO J. 20: 387-396 (2001)). Both molecules may be used to inhibit TAP activity in the present invention. The above mentioned viruses include a plurality of subspecies and strains, and they may preferably be used in this invention, so long as the proteins encoded by the corresponding genes have the TAP-inhibitory activity. In addition, these  
10 proteins include not only wild-type proteins but also the modified proteins, so long as they maintain TAP-inhibitory activity. For example, a partial peptide having TAP inhibitory activity may be used. Furthermore, other peptides, such as tags, may be added. For example, a protein with a His tag may be used (see Examples).

Specifically, in the present invention, the ICP47 and US6 proteins include proteins  
15 comprising amino acid sequences having 68% or more, preferably 70% or more, more preferably 75% or more, more preferably 80% or more, more preferably 85% or more, more preferably 90% or more, and more preferably 95% or more identity to amino acid sequence of the above described ICP47 protein (such as NP\_044675, P03170 (SEQ ID NO: 52), or NP\_044543) and the US6 protein (such as AAL67143 (SEQ ID NO: 54), NP\_040091, or NP\_612779), respectively.  
20 Identity of amino acid sequence may be calculated according to the method mentioned in the present description. For example, the identity score to the entire amino acid sequence of the ICP47 protein (such as NP\_044675, P03170 (SEQ ID NO: 52), or NP\_044543) or the US6 protein (such as AAL67143 (SEQ ID NO: 54), NP\_040091, or NP\_612779) may be calculated.

Moreover, in the present invention, the ICP47 and US6 proteins include those encoded by  
25 nucleic acids hybridizable to 30 nucleotides or more, preferably 50 nucleotides or more, more preferably 100 nucleotides or more, more preferably 150 nucleotides or more, and more preferably the entire sequence within the protein coding sequences for the above described ICP47 protein (such as 145311-145577 of NC\_001806 or 147775-148035 of NC\_001798) and for the US6 protein (such as AY072775 or NC\_003521) under the stringent conditions, respectively. The  
30 stringent hybridization conditions include those described above.

While any desired expression vector may be used for the expression of the TAP inhibitory protein, mammalian cell-infecting virus vectors are preferred. The vector may be constructed in a way capable of co-expressing an epitope-fused MHC class I heavy chain or an epitope-fused  $\beta$ 2m, which will be described later, in addition to expressing the TAP inhibitor.

35 While inhibition of TAP activity may be transient, it is preferably continued for a time (for example, 3 hours or more, preferably 6, 18, 24, or 30 hours or more) sufficient to allow for the

expression the epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$ . For example, in the step of expressing the epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$  in the cells, inhibition of TAP activity may be continued until an exogenous epitope is significantly displayed.

More preferably, an acid treatment step is included in addition to the step of inhibiting TAP activity in the method of the present invention to exhibit an enhanced display of the exogenous epitope. There is no restriction on the order of the acid treatment. It may be carried out before, after, or at the same time the step of inhibiting TAP activity or expressing the epitope-fused protein in the cells. For example, one specific method of the acid treatment in the case of co-expressing the TAP inhibitor and the epitope-fused protein using an expression vector comprises the steps of: (i) expressing the TAP inhibitory protein and the epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$  in cells; and (ii) treating the cells with an acid. While endogenous antigen processing will be intercepted by the step of inhibiting TAP activity, already displayed epitope peptides on the cell surface may be dissociated by acid treatment of the cells. Herein, acid treatment denotes exposure of the cells to an acidic environment such that an epitope peptide displayed on the cell surface is significantly dissociated. The acid treatment may be carried out, for example, by treating cells with a peptide-stripping buffer (0.13 M citric acid (pH3), 66 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl, and 17  $\mu\text{g/ml}$  Phenol Red), at  $4^\circ\text{C}$  for 1 min, followed by neutralization using sufficient amounts of culture medium (for example, RPMI1640). Those skilled in the art are able to perform the acid treatment via other protocols achieving similar effect.

Any desired epitope may be used to be bound to the MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$ . As used herein, the term "epitope" refers to a peptide recognized by immune cells. Such immune cells include T cells, B cells, NK cells, and NKT cells. In the present invention, a preferred epitope includes a peptide recognized by T cells. The epitopes include not only those displayed on antigen-presenting cells, but also any desired peptide, so long as it can be recognized by an immune cell. For example, a peptide having an artificially prepared amino acid sequence may also be used as the epitope. More preferably, the epitope is a peptide displayed on an antigen-presenting cell (APC) or a peptide containing a portion thereof. In the present invention, a "portion" of a protein or a peptide to be used as an epitope contains generally 8 or more, preferably 9 or more, more preferably 10 or more, 12 or more, or 15 or more contiguous amino acids. In addition, in the present invention, while epitope peptides displayed through an antigen processing within the cells are referred to as endogenously displayed epitopes within the cells, other epitopes are referred to as "exogenous epitopes". For example, even if an amino acid sequence of an epitope is identical to that of an endogenously displayed epitope, the epitope added exogenously or displayed without the endogenous antigen processing is included in exogenous epitopes in the present invention. Also, epitope peptides covalently bound to such proteins that constitute MHC, including the MHC class I heavy chain and  $\beta 2m$  in a form of fusion protein, are

included in exogenous epitopes in the present invention. The method of the present invention using TAP inhibitors enables the display of an exogenous epitope on the cells in high frequency by inhibiting the intracellular antigen processing.

The exogenous epitope may be bound to either an MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$ .

- 5 There is no limitation on the epitope to be used in the present invention, and a variety of desired epitopes having therapeutic effects against, for example, tumors, infectious diseases, and other general diseases may be used. Chain length of the peptide as the epitope may be appropriately changed, but generally an 8 or more amino acid peptide, for example, approximately a 10 amino acid peptide is preferably used. When an epitope is bound to  $\beta 2m$ , the epitope may be connected  
10 with any site of  $\beta 2m$ , but preferably, for example, it is connected to the N-terminus of the secreted  $\beta 2m$  molecule. For this purpose, the epitope is bound next to the secretory signal of  $\beta 2m$ , and then linked to the  $\beta 2m$  protein via a spacer sequence if necessary, to produce the desired fusion protein. Alternatively, the epitope may be linked directly to  $\beta 2m$  without a spacer. The amino acid sequence of the spacer is not limited in any way; however, preferred peptides used as the  
15 spacer include those comprising an amino acid sequence, for example, Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 1) or repeated sequences thereof, (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>. The number of repetition (n) is not limited, and it can be, for example, 1 to 5 (1, 2, 3, 4, or 5). When used, it is preferable to use a spacer having a length of up to 16 amino acids, for example, 4, 8, or 16 amino acids. Any desired mammalian  $\beta 2m$  molecule may be used as  $\beta 2m$  without limitations. When used for humans,  
20 human  $\beta 2m$  is preferred. The human  $\beta 2m$  gene may be isolated according to the method as described in the Examples below, for example. In addition,  $\beta 2m$  may be a wild type protein or a mutant type protein with altered amino acid sequences.

- When an epitope is bound to the MHC class I heavy chain, the epitope may be bound to any desired site of the MHC class I heavy chain, but preferably it is bound to a site where the  
25 epitope is placed at the N-terminus of the MHC class I molecule after the secretion. For this purpose, the epitope may be bound next to a secretory signal sequence of the MHC class I heavy chain, and then linked to the MHC class I heavy chain via a spacer if necessary, to produce the desired fusion protein. Alternatively, the epitope may be linked directly to the MHC class I heavy chain without a spacer.

- 30 The amino acid sequence of the spacer is not limited in any way, but preferred peptides used as the spacer include those comprising an amino acid sequence, for example, Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2) or repeated sequences thereof, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>. The number of repetition (n) is not limited, and it can be, for example, 1 to 5. According to a report using the mouse MHC class I molecule H2-K<sup>d</sup>, when spacer sequences were compared  
35 among a 10 amino acid spacer GGPGGGSGGG (SEQ ID NO: 3), a 20 amino acid spacer GGP(GGGGS)<sub>2</sub>GGGSGGG (SEQ ID NO: 4), and a 30 amino acid spacer

GGP(GGGGS)<sub>4</sub>GGGSGGG (SEQ ID NO: 5), the 10 amino acid spacer sequence was recognized most effectively (Mottez, E. *et al.*, J. Exp. Med. 181: 493-502 (1995)). Moreover, according to a report using the human MHC class I molecule HLA-A2, a melanoma antigen epitope was effectively displayed using a 10 amino acid spacer sequence (GGSGGGASGG) (SEQ ID NO: 6) (Kang, X. *et al.*, Cancer Res. 57: 202-205 (1997)). Thus, binding of epitope via these spacer sequences may be preferred.

There is no particular limitation on the origin of the MHC class I heavy chains. Human MHC class I molecules (HLA) are preferably used for human applications. Human MHC class I molecules are called human leukocyte antigens (HLA) and are quite rich in variety. Any of these molecules can be used as the HLA in the present invention. For example, the present invention may be applied to any type of HLA whose target epitope has been identified in infectious diseases and cancers, and they may be used as custom-made or tailor-made reagents or medicines.

In particular, HLA-A24 (approximately 60 to 70%), HLA-A2 (approximately 40%), and HLA-A26 (approximately 20%) are high frequent HLA types in Japanese, followed by HLA-A11 (20%), HLA-A31 (up to 20%), and HLA-A33 (up to 20%). These HLA types are particularly preferred when the invention is applied to a Japanese subject.

For the purpose of developing reagents or medicines applicable to a certain extent of many unspecified individuals in, for example a Japanese subject, HLA types having 5% or more allele frequency among Japanese population (namely, 10% or more HLA type frequency among Japanese) are preferred. Such HLA types include:

A locus	B locus
A*0201	B*0702
A*0206	B*1501
A*1101	B*3501
A*2601	B*4001
A*31012	B*4002
A*3303	B*44031
	B*4601
	B*52011
	B*5401

In the Examples, the present inventors used A24-restricted HLA class I heavy chain as the MHC class I molecule and an HIV-1 derived epitope displayed on the A24-restricted HLA class I molecule as the epitope. Approximately 60 to 70% of the Japanese population have the genotype HLA-A\*2402. Therefore, the A24-restricted HLA class I heavy chain, particularly A\*2402 (Litte, A.-M., Immunogenetics 35: 41-45 (1992)) is suitable when applied to the Japanese population. The MHC class I heavy chain may be a wild type protein or a mutant type protein

with an altered amino acid sequence.

An epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$  and a TAP inhibitory protein may be prepared as recombinant proteins using publicly known recombinant gene technologies (J. Sambrook and D.W. Russell eds., "Molecular cloning: a laboratory manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)). Any desired expression system, including plasmid vectors and virus vectors, may be used, without limitations, as expression vectors for the expression of recombinant proteins. A variety of expression vector-host cell systems for recombinant protein production is known, and any desired host cells, for example, bacteria, yeast, animal cells, and plant cells, can be used. Recombinant proteins thus expressed may be purified in a substantially pure form using known methods for the purification of proteins. In one preferred embodiment of the present invention, an epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$  may be expressed in mammalian cells. This expression in mammalian cells may enhance efficiency of antigen presentation to immune cells compared with those in *E.coli*, since expression in mammalian cells allows normal modifications of the expressed protein with sugar chains or the like. Vectors expressible in mammalian cells may be used not only to produce a recombinant protein, but also to introduce it into cells and to display an exogenous epitope on the surface of a target cell. Expression of an epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$ , and a TAP inhibitory protein in mammalian cells may preferably be done by introducing a mammalian cell-infecting virus vector into the cells.

Both genes encoding an epitope-linked- $\beta 2m$  and a membrane bound form of the MHC class I heavy chain may be introduced into cells to express large amounts of MHC class I/peptide complex that will display a specific epitope on the cell surface. These cells have an excellent antigen presenting ability against epitope specific CTL.

Namely, the present invention provides:

(1) A method for producing an MHC class I heavy chain fused with an epitope or  $\beta 2m$  fused with said epitope, wherein said method comprises the steps of:

(a) inhibiting TAP activity in a cell; and

(b) expressing said MHC class I heavy chain fused with said epitope or said  $\beta 2m$  fused with said epitope in said cell.

(2) The method of (1), wherein said method further comprises a step of an acid treatment.

(3) The method of (1) or (2), wherein said step of inhibiting TAP activity in a cell is a step of contacting a protein having a TAP inhibitory activity with said cell or introducing a vector encoding said protein into said cell.

(4) The method of (3), wherein said protein having a TAP inhibitory activity is US6 or ICP47.

(5) The method of (3), wherein said vector is a mammalian cell-infecting virus vector.

(6) The method of (5), wherein said vector is a Sendai virus vector.

(7) A composition comprising an MHC class I heavy chain fused with an epitope or  $\beta 2m$  fused with said epitope, wherein said MHC class I heavy chain fused with said epitope or said  $\beta 2m$  fused with said epitope is produced by a method of any one of (1) to (6).

The present invention also relates to a method for the production of mammalian cells that  
 5 express the epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$ . Specifically, the method comprises the steps of: (a) inhibiting TAP activity in mammalian cells; and (b) expressing a gene encoding the MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$  fused with an epitope in the cells. There is no restriction on the order of the steps (a) and (b). Either step may be done first, or both steps may be done at the same time. Cells thus obtained may be useful for inducing an antigen-specific cellular immunity.  
 10 For example, antigen-specific cellular immunity may be induced inside of a patient's body, by expressing a desired exogenous epitope in a high frequency in cells derived from the patient (for example, dendritic cells) using this method. In particular, the step of inhibiting TAP activity in mammalian cells may preferably be carried out through introduction of a vector encoding a protein having the TAP inhibitory activity into the cells. This leads to the expression of the TAP  
 15 inhibitory protein in the cells. When the steps (a) and (b) are carried out simultaneously, the present invention also includes a step of co-introducing vectors encoding a protein having the TAP inhibitory activity and the epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$  into cells, and a step of co-expressing the both proteins from a single vector by inserting the gene encoding the protein having the TAP inhibitory activity into the vector encoding the epitope-fused MHC class I heavy  
 20 chain or  $\beta 2m$ . Alternatively, the step (b) may be applied to cells in which the TAP gene has been deleted or its expression has been suppressed. The epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$  thus produced may be recovered from these cells or the culture supernatant. The cells with deletion of the TAP gene can be prepared by, for example, a known gene targeting method. A conditional control of the TAP gene expression may also be possible using the Cre-loxP system or the like.  
 25 The present invention provides mammalian cells in which TAP activity is inhibited and yet containing a gene encoding the epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$  in an expressible way. In addition, the present invention provides mammalian cells that contain a TAP inhibitor or a gene encoding the TAP inhibitor in an expressible way, and also contain a gene encoding the epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta 2m$  in an expressible way. Herein, the  
 30 phrase "a cell contains a gene in an expressible way" means that the gene is expressed in the cell or the gene is retained within the cell so that its expression is inducible using drugs or the like. For example, it includes cells capable of inducibly expressing the gene using an inducible promoter or the Cre-loxP system.

Namely, the present invention provides:

35 (1) A mammalian cell (i) in which TAP activity is inhibited, and (ii) carrying a gene encoding an MHC class I heavy chain fused with an epitope or a gene encoding  $\beta 2m$  fused with the epitope in

an expressible way.

(2) A mammalian cell (i) in which expression of a TAP gene is inhibited, containing a TAP inhibitor, or carrying a gene encoding the TAP inhibitor in an expressible way, and (ii) carrying the gene encoding the MHC class I heavy chain fused with the epitope or the gene encoding  $\beta$ 2m fused with the epitope in an expressible way.

(3) The method of (2), in which the TAP inhibitor is US6 or ICP47.

(4) The method of any one of (1) to (3), in which the gene encoding the TAP inhibitor and/or the gene encoding the MHC class I heavy chain fused with the epitope or  $\beta$ 2m fused with the epitope have been introduced into the cell via a mammalian cell-infecting virus vector.

(5) The method of (4), in which the vector is a Sendai virus vector.

(6) A composition comprising the mammalian cell of any one of (1) to (5).

There is no limitation on the mammalian cell-infecting virus vector and any desired virus vector may be used when a TAP inhibitory protein and/or an epitope-linked  $\beta$ 2m or MHC class I heavy chain is expressed using a mammalian cell-infecting virus vector. In addition, the mammalian cell-infecting virus vector used in the present invention may have an ability to infect cells other than mammalian cells. Preferably, the vector is less toxic to host cells and achieves a high expression level of a transgene. The virus vectors suitable for this invention include, for example, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, herpes simplex virus vectors, retrovirus vectors, lentivirus vectors, Semliki forest virus vectors, Sindbis virus vectors, vaccinia virus vectors, fowl pox virus vectors, and Sendai virus vectors, but the invention is not limited thereto. Using these vector systems, a recombinant virus vector expressing a TAP inhibitor, the epitope-linked-MHC class I heavy chain or  $\beta$ 2m, or a TAP inhibitor and the epitope-linked-MHC class I heavy chain or  $\beta$ 2m, may be constructed. The phrase "recombinant virus vector" as used herein refers to a virus vector generated via a recombinant polynucleotide. The recombinant polynucleotide is defined as a polynucleotide whose end(s) is/are not bound as in natural state. More specifically, it refers to artificially recombined polynucleotide chains or newly generated polynucleotides. The "recombinant" virus vector includes, for example, those constructed by gene manipulation and that prepared by gene amplification of the constructed vectors. The recombinant virus vectors may be generated by reconstituting virus particles through the expression of recombinant virus cDNA in host cells.

The recombinant virus vectors may be prepared according to methods known to those skilled in the art. For example, an adenovirus vector that is most frequently used for gene therapy can be constructed according to the method of Saito *et al.* (Miyake *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1320-24 (1996); Kanegae *et al.*, "Biomanual Series 4- Gene Transfer and Expression, Methods of Analysis" (in Japanese), 43-58(1994), Yodosha). For example, a 42 kb cosmid pAdex1cw (Kanegae *et al.*, Saiboukougaku, 13 (8): 757-763 (1994)) that contains a 31 kb Ad



DNA, almost the full-length adenovirus (Ad) type 5 genome except for E1 and E3 regions, is cleaved with an appropriate restriction enzyme (for example, *SwaI*), and then properly desalted and purified by gel filtration. An expression unit for exogenous genes is then used for a ligation reaction with the cleaved cosmid using T4 DNA ligase, and the enzyme is inactivated by heat treatment. The resulting ligate is desalted by gel filtration, and then cleaved with *SwaI*. After phenol treatment and gel filtration, the cleaved product is subjected again to *SwaI* cleavage. A portion of the product is used for *in vitro* packaging using Gigapack XL (Stratagene, USA). The ligated product is then introduced into *E.coli* cells. Cosmids are prepared from some of ampicillin-resistant transformants of the cells, their structures are analyzed by digestion with restriction enzymes to isolate recombinant cosmids wherein the exogenous gene expression unit is inserted in the desired direction (opposite direction to that of the transcription of E1A and E1B). In another series, a DNA-terminal protein complex (DNA-TPC) of adenovirus type 5 (Ad5 strain d1X) that lacks E1 and E3 regions is prepared by the method of Saito *et al.* (Kanegae *et al.*, supra). This complex is digested, for example, with *EcoT22I*, and then desalted and purified by gel filtration and such. The *EcoT22I*-digested fragments are mixed with the recombinant cosmid obtained as described above, and then introduced into 293 cells using, for example, Cellfect kit (Pharmacia, Sweden). On the next day, the transfected 293 cells are suspended, and the suspension and 10-fold to 100-fold dilution thereof are inoculated onto 96-well plates. Approximately 2 weeks after, a culture solution containing dead cells is isolated from the wells wherein propagation of recombinant Adenovirus (generated via the recombination in the 293 cells) could be observed. The culture solution is repeatedly frozen and thawed to release the adenovirus particles from cells. After centrifugation, the supernatant (primary virus solution) is used for infection of 293 cells spread onto 24-well plates. Three days later, culture solution containing dead cells is isolated. A portion of the solution is frozen and thawed, and centrifuged as for the preparation of the primary virus solution to obtain the supernatant (secondary virus solution). The residual solution is centrifuged to obtain cells. DNA is prepared from the cells and the structure of the recombinant adenovirus DNA is analyzed by digestion with restriction enzymes to select clones that have been confirmed to have the desired DNA structure. The secondary virus solution is used for infection of 293 cells in larger amounts, the culture solution is similarly frozen, thawed and centrifuged to obtain the third virus solution. After determining the titer of the third virus solution according to the method of Saito *et al.* (Kanegae *et al.*, supra), the recombinant adenovirus vector can be obtained (Miyake *et al.*, supra; Kanegae *et al.*, Acta Paediatr. Jpn, 38: 182-188 (1996)).

In addition, for example, retrovirus vectors (Wakimoto *et al.*, Protein Nucleic Acid and Enzyme 40: 2508-2513 (1995)) and adeno-associated virus vectors (Tamaki *et al.*, Protein Nucleic Acid and Enzyme 40: 2532-2538 (1995)) may also be used. Methods of efficiently producing

these vectors are known in the art.

In the interest of producing other vectors that can be used for gene transfer into mammalian cells, Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-502069, Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Hei 6-95937, and JP-B Hei 6-71429  
5 discloses detailed methods for producing recombinant vaccinia viruses. Furthermore, JP-B Hei 6-34727 and Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-505626 disclose methods for producing recombinant papilloma viruses. Moreover, Unexamined Published Japanese Patent Application No. (JP-A) Hei 5-308975 discloses a method for producing recombinant adeno-associated virus, and Published Japanese Translation of International  
10 Publication No. Hei 6-508039 discloses a method for producing recombinant adenovirus.

In the present invention, particularly preferred mammalian cell-infecting virus vectors include Paramyxovirus vectors. Herein, the phrase "Paramyxovirus vectors" refers to vectors (or carriers) derived from Paramyxovirus that transfer genes into host cells. Sendai virus (SeV), which belongs to the family *Paramyxoviridae*, has recently been developed as a gene transfer vector  
15 (Kato, A. *et al.*, EMBO J. 16: 578-589 (1997); WO 97/16538; WO 97/16539). The SeV vector is less toxic and expresses extremely high amounts of proteins from a transferred gene. Furthermore, since genes inserted into the vector are not introduced into the host chromosomes, the SeV vector has an advantage of safety. The SeV vector has a high genome stability, and according to a heterogeneous gene expression experiment, it is shown to stably express the  
20 inserted heterogeneous gene for a long time with little mutations in the bases of the gene in spite of continuous multiple passages (Yu, D. *et al.*, Genes Cells 2, 457-466 (1997)). In addition, the size of the gene that can be introduced and the flexibility of packaging due to the lack of capsid structure protein is another advantageous property of the SeV vector. The SeV vector with replication ability allows for the introduction of an exogenous gene of at least up to 4 kb. In  
25 addition, two or more genes may be simultaneously expressed by adding transcription units to the vector. Virus vectors replicated from a vector based on the replicon of SeV reinfect into adjacent cells. Then, multiple copies of RNP replicated in the cytoplasm of the infected cells distribute over daughter cells during cell division, and thus the vector is expected to continuously express. Moreover, the SeV vector has a wide tissue adaptability.

30 Since Sendai virus vectors are not pathogenic in humans, they are preferred for clinical trials of human gene therapy in view of safety. It is a major obstacle in high efficient gene transfer that, in most cases, introduced DNA must be transported into the nucleus or nuclear membrane must be eliminated for the expression of a transgene via plasmid DNA or such. In the case of Sendai virus, however, expression of an exogenous gene is driven by both cellular tubulin and its  
35 RNA polymerase (L protein) in the cytoplasm when viruses replicate. This suggests that the Sendai virus does not interact with chromosomes of host cells, which avoids risks such as

cancerization and immortalization of cells. Furthermore, the Sendai virus is known to be pathogenic in rodents causing pneumonia, but is not pathogenic in humans, which is supported by studies showing that the intranasal administration of the wild-type Sendai virus does not cause harm in nonhuman primates (Hurwitz, J. L. *et al.*, Vaccine, 15: 533-540 (1997)). These features  
 5 suggest that Sendai virus vector can be utilized in human therapy, and further support the notion that Sendai virus vectors are one of the promising tools for gene therapy *in vivo* or *ex vivo*.

Herein, the term "Paramyxovirus" is defined as a virus of the *Paramyxoviridae* family or a derivative thereof. Paramyxoviruses used in the present invention include, for example, viruses belonging to the *Paramyxoviridae*, such as Sendai virus, Newcastle disease virus, Mumps virus,  
 10 Measles virus, Respiratory syncytial virus, rinderpest virus, distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), and type I, II, and III human parainfluenza virus. In the present invention, preferred paramyxoviruses include those belonging to the subfamily *Paramyxoviridae* (including the genera of Respirovirus, Rubulavirus, and Mobillivirus), more preferably the genus Respirovirus (also called Paramyxovirus) or a derivative thereof. Respiroviruses that can be used in the present  
 15 invention include, for example, type I human parainfluenza virus (HPIV-1), type III human parainfluenza virus (HPIV-3), type III bovine parainfluenza virus (BPIV-3), Sendai virus (also called type I mouse parainfluenza virus), and type X simian parainfluenza virus (SPIV-10). In the invention, most preferred Paramyxovirus is Sendai virus. These viruses may be naturally occurring, wild-type, mutant, laboratory-passaged, artificially constructed strains, etc.  
 20 Incomplete viruses such as the DI particle (Willenbrink, W. and Neubert, W.J., J. Virol. 68: 8413-8417 (1994)) and synthesized oligonucleotides may be utilized as a material for generating the virus vector.

The recombinant Paramyxovirus vector may be generated by constructing a recombinant DNA containing a DNA encoding the virus genome linked to an appropriate promoter, transcribing  
 25 the construct *in vitro* or *in vivo*, reconstituting RNP in the presence of Paramyxovirus L, P, and NP proteins, and forming a virus particle containing the RNP. Reconstitution of virus from the vector DNA may be carried out according to the methods known to those skilled in the art (Hasan, M.K. *et al.*, J. Gen. Virol. 78: 2813-2820 (1997); Kato, A. *et al.*, EMBO J. 16: 578-587 (1997); Yu, D. *et al.*, Genes Cells 2: 457-466 (1997); WO 97/16539; WO 97/16538; Durbin, A.P. *et al.*, Virol. 235: 323-332 (1997); Whelan, S.P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392 (1995); Schnell, M.J. *et al.*, EMBO J. 13: 4195-4203 (1994); Radecke, F. *et al.*, EMBO J. 14: 5773-5784 (1995); Lawson, N.D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481 (1995); Garcin, D. *et al.*, EMBO J. 14: 6087-6094 (1995); Kato, A. *et al.*, Genes Cells 1: 569-579 (1996); Baron, M.D. and Barrett, T., J. Virology 71: 1265-1271 (1997); Bridgen, A. and Elliott, R.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404 (1996)). These methods enable the reconstitution of desirable Paramyxovirus  
 35 vectors, including the parainfluenza virus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, measles virus,

rinderpest virus, and Sendai virus vectors, and the other (-) strand RNA viral vectors from DNA. Paramyxovirus vectors are generally prepared by the steps of: (a) transcribing a vector DNA encoding a negative single-stranded RNA or its complementary strand (positive strand) derived from Paramyxovirus in cells (helper cells) expressing the NP, P, and L proteins; and (b) culturing the cells and recovering virus particles from the culture supernatants. The RNA transcribed from the vector DNA forms an RNP complex with the NP, L, and P proteins, leading to the generation of virus particles encapsulated in outer envelope containing envelope proteins.

Additional virus vectors in the present invention include those with deletions of virus genes. For example, a replication deficient type virus vector in which an essential gene for the replication of virus has been deleted may be used. When the F gene and/or the HN gene or such are deleted in the Paramyxovirus vector DNA, the virus itself does not form infectious virus particles. Infectious virus particles can be assembled by introducing these deleted genes and/or genes encoding envelope proteins from another virus into the virus-producing cells and expressing them separately. These deletion type virus vectors can also be produced according to or based on the methods known to those skilled in the art (WO 00/70055 and WO 00/70070). Expression levels of the exogenous gene from the vector can be controlled by, for example, the type of transcriptional initiation sequence, which will be added upstream of the gene (WO 01/18223). In addition, virus vectors also include pseudotype virus vectors that contain envelope proteins from other viruses. Such an envelope protein may be VSV-G, for example (WO 00/70055 and WO 00/70070).

The collected animal cell-infectious virus vector may be purified to be substantially pure. The purification can be carried out by known purification/separation methods, including filtration, centrifugation, and column purification, or combinations thereof. The phrase "substantially pure" means that the virus vector is the major portion of a sample in which it is present as a component. Typically, a sample can be confirmed to be a substantially pure virus vector when proteins derived from the virus vector occupy 10% or more, preferably 20% or more, more preferably 50% or more, more preferably 70% or more, more preferably 80% or more, and even more preferably 90% or more, of the total proteins (but excluding proteins added as carriers or stabilizers) in the sample. Specific examples of purification methods for Paramyxovirus include methods using cellulose sulfate ester or cross-linked polysaccharide sulfate ester (JP-B Sho 62-30752; JP-B Sho 62-33879; and JP-B Sho 62-30753), and those including adsorption of the virus with fucose sulfuric acid-containing polysaccharide and/or its degradation product (WO 97/32010).

A high frequency expression of a desired epitope within the cells may be achieved by introducing a mammalian cell-infecting virus vector encoding a TAP inhibitory protein and epitope-linked- $\beta$ 2m or MHC class I heavy chain in an expressible way into mammalian cells.

The present invention provides a method for producing an epitope-linked- $\beta$ 2m or an epitope-linked MHC class I heavy chain, which comprises a step of introducing into mammalian cells (one or more) mammalian cell-infecting virus vectors encoding: (i) a TAP inhibitory protein; and (ii) an epitope-linked- $\beta$ 2m or an epitope-linked MHC class I heavy chain in an expressible way. The mammalian cell-infecting virus vectors encoding (i) and (ii) may be different or the same, in the present invention.

Moreover, the present invention provides mammalian cells in which (one or more) mammalian cell-infecting virus vectors encoding in an expressible manner: (i) a TAP inhibitory protein; and (ii) an epitope-linked- $\beta$ 2m or an epitope-linked MHC class I heavy chain have been introduced. The mammalian cell-infecting virus vectors encoding (i) and (ii) may be different or the same, in the present invention. Moreover, the present invention provides the above mammalian cells in which a mammalian cell-infecting virus vector encoding an epitope-free MHC class I heavy chain in an expressible manner has further been introduced when an epitope is linked to  $\beta$ 2m, or that encoding an epitope-free  $\beta$ 2m in an expressible manner has further been introduced when the epitope is linked to MHC class I heavy chain. These vectors may be the same or different as those encoding the TAP inhibitory protein and the epitope-linked proteins. US6 and ICP47 are the specific examples of the TAP inhibitory protein. In addition, Paramyxovirus vectors are especially preferred as mammalian cell-infecting virus vectors.

An epitope-linked- $\beta$ 2m expressed by the method of the present invention may be used for an *in vitro* CTL assay. Target cells for the CTL assay generally include cell lines derived from the same individual as the CTL. For example, cells of Epstein-Barr virus-transformed B cell line (auto-lymphoblastoid cell line, auto-LCL) pulsed with a synthetic peptide may be used as the target cells. Alternatively, instead of using the synthetic peptide, epitope-linked- $\beta$ 2m prepared by the method of the present invention may be added or the virus vector expressing, for example, the TAP inhibitory protein and the epitope-linked- $\beta$ 2m may be infected into the auto-LCL. Cells of human cell lines can be used similarly through co-infection of virus vectors that express, for example, TAP inhibitory protein, a desired MHC class I heavy chain (membrane-bound form), and an epitope-linked- $\beta$ 2m, which will be displayed on the MHC class I heavy chain, respectively.

Moreover, epitope-linked- $\beta$ 2m produced by the method of this invention may be used to establish epitope-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). Such epitope-specific CTL can be established via specific single or multiple stimulations *in vitro*. For example, HIV Nef138-10-specific CTL can be established by stimulating HIV-infected individual's peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with irradiated autologous PBMC pulsed with the HIV Nef138-10 peptide, and then co-culturing in the presence of IL-2. Herein, a synthetic peptide is usually used, but culture supernatant of cells infected with a virus vector that expresses the epitope-linked- $\beta$ 2m (*i.e.*, free form epitope-linked- $\beta$ 2m protein) shows a similar effect.

Epitope-specific CTL may also be established by infection of a virus vector expressing, for example, the TAP inhibitory protein and the epitope-linked- $\beta$ 2m to the stimulator cells.

5 The epitope-linked- $\beta$ 2m obtainable by the method of the present invention may be used to induce an antigen-specific cellular immune response. Namely, the epitope-linked- $\beta$ 2m obtained from the present invention may act as an inducer of an antigen-specific cellular immune response. The epitope-linked- $\beta$ 2m obtained according to the present invention may be used to induce the antigen-specific cellular immune response.

Moreover, an epitope-linked- $\beta$ 2m expressed via an SeV expression system, which binds to the HLA-A\*2402 molecule on the cell surface as a secretory protein, can present an antigen to CTL efficiently. The epitope-linked- $\beta$ 2m produced by the method of the present invention may be used as a protein preparation. That is, a clinically useful inducer of an antigen-specific cellular immune response may be obtained by purifying the epitope-linked- $\beta$ 2m and removing contaminant viruses from it. The epitope-linked- $\beta$ 2m produced by the method of the present invention may be useful as a component of pharmaceutical compositions.

15 For example, induction of an antigen-specific cellular immune response using the epitope-linked- $\beta$ 2m may be conducted specifically by a method comprising a step of contacting the epitope-linked- $\beta$ 2m with (epitope-specific) CD8-positive T cells.

For example, the epitope-linked- $\beta$ 2m is useful for establishing *in vitro* epitope-specific CTL cell lines. Epitope-specific CTL cell lines can be established by one to several rounds of specific stimulations *in vitro*. For example, to establish HIV Nef138-10-specific CTL cell lines, PBMC from HIV-1-infected individuals are stimulated with irradiated autologous PBMC pulsed with the HIV Nef138-10 peptide, and then co-cultured in the presence of IL-2. Herein, synthetic peptides are generally used for the stimulation; however, a similar effect can be achieved by addition of the epitope-linked- $\beta$ 2m produced according to the method of the present invention.

25 In addition, epitope-linked- $\beta$ 2m is useful to pulse target cells in CTL assays *in vitro*. Target cells in the CTL assays may be pulsed with the epitope-linked- $\beta$ 2m produced according to the method of the present invention instead of using the synthetic peptide, which gives the same result as with the synthetic peptide. Generally, a complex of an MHC class I heavy chain (membrane-bound form)+  $\beta$ 2m + peptide is already expressed on the cell surface. Pulsing with a peptide is intended to replace the peptide portion of the complex with the pulsed peptide. An efficient exchange of the  $\beta$ 2m and peptide portion of the complex is suggested to occur when pulsed with the epitope-linked- $\beta$ 2m. The pre-existing epitope peptides may be removed by an acid treatment.

35 Epitope-linked- $\beta$ 2m is also useful to pulse patient's dendritic cells *ex vivo*. Peripheral blood mononuclear cells are isolated from a patient and then differentiation to dendritic cells is induced by a standard method. For example, dendritic cells in which virus vectors expressing an

epitope-linked- $\beta$ 2m and a TAP inhibitory protein have been introduced are administered to the patient subcutaneously. As a result, the epitope-linked- $\beta$ 2m is expected to induce epitope-specific CTL due to its expression on the cell surface as a complex of an MHC class I heavy chain and the epitope-linked- $\beta$ 2m similarly as in the *in vitro* experiment. Since the  
5 dendritic cells pulsed with the epitope-linked- $\beta$ 2m is expected to express the epitope on the MHC class I heavy chain stably for a long time with higher density than cells pulsed with a peptide, it may be used as a cellular vaccine (therapeutic vaccine).

The mammalian cell-infecting virus vector encoding an epitope-linked- $\beta$ 2m or an MHC class I heavy chain in an expressible way can be used to induce an antigen-specific cellular  
10 immune response in combination with a vector capable of expressing a TAP inhibitor or a TAP inhibitory protein. The present invention relates to a composition comprising: (i) a TAP inhibitor or a vector encoding the TAP inhibitor in an expressible way; and (ii) (a) an epitope-linked- $\beta$ 2m or an epitope-linked MHC class I heavy chain, or (b) a vector encoding an epitope-linked- $\beta$ 2m or an epitope-linked MHC class I heavy chain in an expressible way. The vector may be suspended  
15 appropriately in a pharmaceutically acceptable solution. For example, the vector may be contained in a physiological saline, a culture solution, or serum. The composition may be useful as an enhancer for displaying an exogenous epitope on MHC class I. The composition may also be useful as an inducer of an antigen-specific cellular immune response. The vector encoding the TAP inhibitory protein may be different from that encoding the epitope-linked- $\beta$ 2m or encoding  
20 the MHC class I heavy chain, or alternatively, a single vector may encode these proteins. Namely, the present invention also includes a vector encoding both the TAP inhibitor and either of the epitope-linked- $\beta$ 2m or MHC class I heavy chain in an expressible way. Moreover, the present invention relates to uses of: (i) a TAP inhibitor or a vector encoding the TAP inhibitor in an expressible way; and (ii) an epitope-linked- $\beta$ 2m or an MHC class I heavy chain, or a vector  
25 encoding the epitope-linked- $\beta$ 2m or MHC class I heavy chain in an expressible way, to raise the exogenous epitope levels displayed on MHC class I, and to induce an antigen-specific cellular immune response. These virus vectors are useful for gene therapy. The present invention provides pharmaceutical compositions comprising: (i) a TAP inhibitor or a vector encoding the TAP inhibitor in an expressive way; and (ii) an epitope-linked- $\beta$ 2m or an MHC class I heavy chain,  
30 or a vector encoding the epitope-linked- $\beta$ 2m or MHC class I heavy chain in an expressible way. In addition, the present invention relates to a kit for displaying an epitope, comprising: (i) a TAP inhibitor or a vector capable of expressing the TAP inhibitor; and (ii) an epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta$ 2m, or a vector capable of expressing the epitope-fused MHC class I heavy chain or  $\beta$ 2m. (i) and (ii) may be separated if possible, or mixed. The kit may include multiple kinds  
35 of TAP inhibitors or vectors capable of expressing them, and may also include multiple kinds of MHC class I heavy chains or  $\beta$ 2m, or vectors capable of expressing the multiple kinds of MHC

class I heavy chains or  $\beta 2m$ . These may be appropriately dissolved or suspended in a pharmaceutically acceptable solution. Particularly preferred vectors are animal cell-infecting virus vectors. The compositions containing the vector and the kit of the present invention are useful to induce antigen-specific immune responses for infectious diseases, cancers, and such, due to their antigen-specific cellular immune response-inducing ability. Applications of the compositions or the kit of the present invention to gene therapy may be achieved through gene expression by either a direct (*in vivo*) administration or an indirect (*ex vivo*) administration of the compositions or the kit.

For example, in the process of *in vitro* establishment of epitope-specific CTL cell lines, stimulation of stimulator cells may be achieved by applying the above compositions or kit instead of using a synthetic peptide.

The compositions and the kit of the present invention may also be used to pulse target cells in an *in vitro* CTL assay. Auto-LCL cells infected with a virus vector expressing epitope-linked- $\beta 2m$  under conditions wherein TAP is inhibited, for example, instead of using a synthetic peptide, may be used as target cells to detect cytotoxic activities. In addition, to use human cell lines as target cells, they may be co-infected with a virus vector expressing a desired MHC class I heavy chain (membrane-bound form) and a virus vector that expresses an epitope-linked- $\beta 2m$  presented by the MHC class I heavy chain and a TAP inhibitory protein.

Furthermore, the composition and the kit of the present invention are useful for *ex vivo* expression of an epitope in patient's dendritic cells. Peripheral blood mononuclear cells are isolated from a patient and induced to differentiate into dendritic cells by a standard method. The composition of the present invention is administered to the dendritic cells, and then the cells are inoculated to the patient subcutaneously. Especially, a gene transfer using a virus vector may be suitable. The important point here is how long the expression of a pulsed peptide or the epitope-linked- $\beta 2m$  protein continues on the surface of the pulsed dendritic cells. In fact, when the cells are pulsed with a peptide, the expression of the epitope on the cell surface of the dendritic cells disappears in a short term. In contrast, a long time expression of the epitope-linked- $\beta 2m$  can be achieved via the infection of the dendritic cells with the virus vector to allow intracellular expression of the epitope-linked- $\beta 2m$ . Furthermore, the compositions and the kit of the present invention are also useful for *in vivo* gene therapy wherein epitope-specific CTL is induced by *in vivo* administration of the compositions and the kit.

Target cells for gene transfer to express the exogenous epitope preferably include those having antigen presenting ability. Such cells particularly include dendritic cells (DC). For example, a desired MHC class I/peptide complex may be formed in a high frequency in the dendritic cells by introducing a vector expressing an exogenous epitope-linked- $\beta 2m$  or an MHC class I heavy chain into the dendritic cells *ex vivo*, using the method of the present invention. The



resultant cells may be used for the activation of antigen-specific T cells. Mammalian cells in which a gene encoding the epitope-linked- $\beta$ 2m or an MHC class I heavy chain has exogenously been introduced and yet TAP activity has been inhibited, are included in the present invention.

Desired isolated cells having an antigen-presenting ability may be used as the mammalian cells.

5 In particular, an exogenous gene encoding a subunit of an MHC class I/peptide complex, which is not linked to the epitope, may also be introduced into the cells, to form a large amount of the MHC class I/peptide complex. The transgene may be encoded by an expression vector outside the chromosome or integrated into the cellular chromosome. When a membrane-bound form of the MHC class I heavy chain is expressed, a membrane-bound MHC class I/peptide complex is  
10 expressed on the cell surface. Such cells have an excellent antigen-presenting ability to epitope-specific CTL. Above mentioned mammalian cells in which an exogenous gene encoding the epitope-linked- $\beta$ 2m or the epitope-linked MHC class I heavy chain has been introduced and yet TAP activity has been inhibited may also be used as a component of pharmaceutical compositions.

15 The compositions of the present invention may be combined with desired pharmaceutically acceptable carriers or vehicles as necessary. Herein, the phrase "pharmaceutically acceptable carriers or vehicles" denotes materials capable of being administered to cells and that do not significantly inhibit activities of the active ingredients. For example, the composition of the present invention may include physiological saline,  
20 phosphate-buffered saline (PBS), etc. When a Paramyxovirus vector has been propagated in chicken eggs, the composition containing the vector may contain allantoic fluid. Moreover, the composition containing cells may be suspended in physiological saline, PBS, culture solution, or the like. In addition, the composition of the present invention may contain carriers or vehicles such as deionized water and 5% dextrose solution. Furthermore, it may contain others, including  
25 vegetable oils, suspending agents, detergents, stabilizers, and antibiotics. In addition, preservatives and other additives may be added. The compositions of the present invention are useful as reagent and medicines. The compositions are further useful as vaccines. The present invention also relates to uses of the compositions of the present invention as reagents, medicines, or vaccines. To enhance immunogenicity, the vaccine compositions may also contain immune  
30 accelerators including cytokines, cholera toxins, and salmonella toxins. Furthermore, the vaccines may be combined with adjuvants including alum, incomplete Freund's adjuvant, MF59 (oil emulsion), MTP-PE (muramyl tripeptide derived from Mycobacterium cell wall), and QS-21 (derived from soapbark tree *Quilaja saponaria*).

Moreover, cytokines can be effectively combined to enhance the adjuvant effect of the  
35 pharmaceutical compositions of the present invention for administration. Such combinations include: i) combination of IL-2 and single-stranded IL-12 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(15):

8591-8596 (1999)), ii) combination of IL-2 and interferon- $\gamma$  (US Pat. No. 5,798,100), iii) GM-CSF alone, and iv) combination of GM-CSF and IL-4 for the treatment of brain tumors (J. Neurosurgery 90(6): 1115-1124 (1999)).

5 The vaccines of the present invention may be applied, for example, to tumors, infectious diseases, and other general diseases. For the treatment of infectious diseases, for example, epitopes of antigen proteins of infectious microorganism are analyzed, and then  $\beta$ 2m or MHC class I heavy chain fused with the epitopes are produced. Antigen proteins include, for example, envelope of virulent strain type H5N1 for influenza; for Japanese encephalitis, the envelope protein (Vaccine 17(15-16): 1869-1882 (1999)); HIV gag or SIV gag proteins (J. Immunology 10 164: 4968-4978 (2000)), HIV envelope proteins, the Nef protein and other virus proteins for AIDS; B subunit (CTB) of cholera toxin (Arakawa, T. *et al.*, Nature Biotechnology, 16(10): 934-8 (1998); Arakawa, T. *et al.*, Nature Biotechnology, 16(3): 292-7 (1998)) as an example of cholera antigens; glycoprotein of rabies virus (Lodmell, D.L. *et al.*, Nature Medicine 4(8): 949-52 (1998)) as an example of rabies antigens; and capsid protein L1 of human papilloma virus type 6 (J. Med. 15 Virol 60: 200-204 (2000)) as an example of cervical cancer antigens. Furthermore, the present invention may be applied to pathogenic Paramyxovirus, such as Measles virus and epidemic parotiditis virus, that highly require the use of vaccines. Moreover, epitopes of antigen proteins including JE-E antigen protein of Japanese encephalitis (JP-A Sho 64-74948, JP-A Hei 1-285498), gD2 protein of human herpes simplex virus (JP-A Hei 5-252965), hepatitis C virus-derived peptide 20 (JP-A Hei 5-192160), and pseudorabies virus-derived polypeptide (Published Japanese Translation of International Publication No. 7-502173), may also be used. For example, cells from patients infected with these pathogenic microorganisms are analyzed to identify epitopes of the antigen proteins presented on antigen-presenting cells (APC). An epitope for the desired HLA type can be identified by selecting a proper HLA type.

25 It is clinically significant in treating tumor to develop diverse and new therapeutic strategies and methods, focusing on tumor-specific antigens. For example, in tumor therapy, an epitope-linked- $\beta$ 2m or MHC class I heavy chain may be expressed in antigen-presenting cells (APC), such as tumor cells or DC cells, or protein products, such as epitope-linked- $\beta$ 2m and MHC class I/peptide complex, may be administered.

30 General means to develop a vaccine therapy includes the use of DC cells known to have antigen-presenting ability to helper T cells (Th) as well as high antigen-presenting ability to CTL via MHC class I molecules (Mayordomo, J.I. *et al.*, Nature Med. 1(12): 1279-1302 (1995)). As an example of tumor immunotherapy, studies to establish a tumor vaccine therapy utilizing the MAGE antigen, which expression is confirmed in a variety of malignant tumors, as a target are in progress by Yasushi Fuji *et al.* (National Hospital Kyushu Cancer Center). The method was 35 applied to 7 cases, including 5 cases of recurrent gastric tumor and a case of recurrent esophagus

tumor. As a result, shrinkage of the metastatic lymph node, a decrease in tumor markers, and improvement of clinical symptoms (hoarseness) were observed in the recurrent esophagus tumor case. In the gastric tumor cases, a decrease in tumor markers was observed in 4 of 6 cases. No side effects were observed, suggesting the safety of the tumor immunotherapy. Moreover, in many cases, improvement of clinical symptoms and a decrease in tumor markers were observed, indicating the possibility that the immunotherapy serves as an effective therapeutic method through selection of the administration route, adaptable cases, and such. Clinical studies on the DC vaccine therapy using the MAGE-3 peptide have been practically started, and are suggested to be a safe and tumor-specific immunotherapy against progressive recurrent digestive organ cancer cases. However, for preventive administration of such vaccines to many patients, it is clearly troublesome and unpractical to find an optimal condition for administration of the dendritic cells as "natural adjuvant" to each patient. Therefore, efficient methods are desired in the art (Yamagishi, H. *et al.*, Oral presentation in the General meeting of Japan society of Cancer Therapy: October 12 (1999), Gifu City). The application of the present invention to such a tumor vaccine therapy may be quite effective.

The prevention of tumorigenesis triggered by viruses may be achieved by preventing infection using a virus vaccine. Thus, virus-caused tumors can be more practically prevented compared with those caused due to other factors. For example, hepatitis C virus (HCV) associated with hepatic tumors, human papillomavirus (HPV) associated with uterine cancer, and HTLV-1 associated with adult T cell leukemia are candidates for vaccines aiming at prevention and therapy of infections. Hepatic tumors share a high ratio in Japanese tumors. Infection by hepatitis C virus occurs non-orally, and at high frequency becomes chronic even in healthy adults with normal immunocompetence. Approximately 20% of the infected individuals are predicted to suffer chronic hepatitis or cirrhosis. Moreover, many of the cirrhosis patients acquire liver cell cancer. While interferon treatment of hepatitis C made it possible to cure a part of the patients, its efficacy was not as initially expected and even now, there is no effective therapy for more than half of the patients. Generally, viral infections are prevented by inducing neutralizing antibodies via vaccination. However, hepatitis C virus is susceptible to mutation and the existence of a neutralizing antibody that interrupts its infection has not been proven so far. Virus infections are known to be protected by inducing CTL in addition to the induction of neutralizing antibodies. The present invention is expected to induce activation of CTL in such virus infections.

Moriyama, T. *et al.* (Jichi Medical School) have been studying methods using genes themselves that encode pathogenic antigens as vaccines (DNA vaccines) as a novel method to induce CTL. The method has problems, such as insufficient expression and the administration site being limited to the muscles, as described in their articles (Kurane, I. "DNA vaccine, present situation and new findings", *Current Concepts in Infectious Diseases* 19(3): 6-9 (2000)). Another

article describes a cancer vaccine that utilizes HER2, a membrane type glycoprotein having tyrosine kinase activity, that is found overexpressed in breast cancers (Kageyama, S., Watanabe, M., Hiasa, A., and Suku, K., "Cancer and immunity, cancer-specific immune therapy, vaccine therapy against breast cancer using a HER-derived peptide", *New Horizon for Medicine* 32(5): 1167-1172 (2000)). For example, cancer vaccines produced using virus vectors according to the present invention are expected to exert higher effect than these DNA vaccines. Highly effective vaccines may be provided by constructing vectors using virus vectors that have a wide expression range among mammal tissues (adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, herpes simplex virus vectors, retrovirus vectors, Lentivirus vectors, Semliki forest virus vectors, Sindbis virus vectors, vaccinia virus vectors, Sendai virus vectors, etc.).

Although uterine cancer is a female-specific tumor, the significance to develop vaccines for the prevention and therapy of HPV infection is the same as other tumors. The main infection route of HTLV-1 is mother-to-child transmission. However, there are also other routes. Although the pathogenicity of recently discovered HGV is unclear, it is widespread in society like HCV, indicating the need to prevent such virus at the perspective of public health. Thus, such virus is also a target for the application of the present invention.

Investigations concerning applications of antigen-presenting cells and the route of administration are also important. The most extensively studied route of administration for vaccine therapy comprises the steps of: (1) differentiating monocytes contained in the peripheral blood into DC *in vitro*; and (2) returning them into the patient's body via intravenous injection. This method utilizes the ability of DC cells to present antigens via MHC class I molecules to CTL. This system requires respectable facilities and time for culture. Recently, vaccine therapy utilizing skin is featured. The investigations of anti-virus vaccine therapy and cancer vaccine therapy utilizing dendritic cells including Langerhans cells (LC) that were recently found to efficiently present endogenous antigens, such as virus antigens and cancer antigens, to CTL via MHC class I molecules on the cell surface are attracting attention. Since many LC cells are on the epidermis of skin, efficient DNA vaccine therapy may be developed by applying virus peptides or genes encoding antigens on the skin. However, LC cells in normal skin are in the dormant state, and have low antigen presenting activity to Th and CTL, as well as poor mobility into the lymph node. Therefore, it is difficult to realize a virus vaccine therapy or cancer vaccine therapy using normal skin. To solve these problems, Naohiro Seo and Masahiro Takigawa (Hamamatsu Univ. School of Medicine), along with colleagues, demonstrated that LC cells on the skin become activated, then move into the lymph node and efficiently present antigens to Th cells by disrupting the most external skin layer, the corneum barrier, through 8 to 15 times repeated tape stripping (TS) (Japanese Patent Application No. Hei 10-316585, "Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis"; *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 97: 371-376 (2000)). This method expands the possibility of virus vaccines and cancer therapy due to its potential to enable application of virus peptides, cancer peptides or antigen DNAs to the barrier-disrupted skin. These administration methods can be applied to the present invention.

5 To accomplish more confident clinical applications, it is important to construct human HLA-restricted cancer-specific CTL cell lines, and clone genes encoding cancer-reactive CTL-inducing antigens recognized by the cell lines to develop target molecules for clinically applicable tumor-specific immunotherapy against cancer patients. Immune response is expected to be induced more efficiently by identifying an epitope presented by an HLA of the same type as  
10 that of a patient, and producing a vaccine vector or peptide vaccine using the identified epitope.

Cancers that frequently occur in the Japanese population include, for example, lung cancer, digestive tract cancer (esophagus, stomach, and colon cancers), liver cancer, head and neck cancer, breast cancer, uterine cancer, oophoroma, nephroma, and leukemia. Among these cancers, it is clinically useful to choose the tissue type of squamous cell carcinoma and  
15 adenocarcinoma as therapeutic targets, because they share most of these cancers in Japanese. Epidermal cancers share not only the majority of adult malignant tumors in Japanese, but also occur most frequently in the world. Therefore, epitopes of epidermal cancer cell-specific antigens are suitably used in the present invention. Moreover, as for HLA, the identification of HLA-A24 (approximately 60% of cancer patients), HLA-A2 (approximately 40%), and HLA-A26  
20 (approximately 20%)-restricted CTL-recognized cancer-regressive antigens are particularly important, since these HLA types are also dominant in Japan. Following these types, identification of antigens intended to HLA-A11 (20%), HLA-A31 (up to 20%), and HLA-33 (up to 20%) are also important. Ninety five percent or more of the Japanese population possess at least one of HLA-A24, -A2, -A26, -A31, and -A33. Furthermore, these HLA alleles are distributed  
25 widely beyond the ethnic difference. Therefore, it is preferable to identify genes encoding cancer-reactive CTL-inducing antigens from cells having these HLA types, and apply them to the present invention.

Kyogo Ito (Medical school of Kurume Univ.) *et al.* have established many specific killer T cells against human HLA class-restricted epidermal cancers (adenocarcinoma and squamous cell  
30 carcinoma) which frequently occur among the Japanese, and cloned genes encoding antigens recognized by the cells and that have the ability to induce epidermal cancer-reactive CTL. Furthermore, they identified cancer antigen peptides encoded by the genes, and have been analyzing their *in vitro* killer T cell-inducing abilities (Tou, U., Yamana, H., Sueyoshi, S., Shintani, F., Tanaka, T., Kubota, M., Mine, T., Sasahara, H., and Ito, K., "Cloning and analysis of an antigen  
35 gene from the peripheral blood lymphocytes after the specific adoptive immunotherapy by a local injection of CTL from a patient carrying esophagus cancer", The Japanese Society of

Gastroenterological Surgery 33(7): 1191 (2000)). Hitherto, 4 genes (SART-1 to SART-4) and 3 genes from squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cDNA libraries, respectively, were cloned and their coding proteins were analyzed. Selective apoptosis was induced in cancer cells introduced with the SART-1 gene. In addition, the HLA-A24-restricted peptide (SART-1

5 690-698) strongly induced CTL, and the HLA-A26-restricted peptide (SART-1 736-744) induced CTL in cancer patients with HLA-A2601, -A2602, or -A2603 (Yamana, H. and Ito, K. (Medical School of Kurume Univ.), "Antigen peptide therapy of tumors; cancer immunotherapy using the SART-1 antigen peptide", Journal of Clinical and Experimental Medicine 190(2): 129-133 (1999); Inoue, K. (Research Institute of National Cancer Center), Nakao, M., Matsunaga, K.,

10 Matsuoka-kikuchi, S., Yamana, H., and Ito, K. (Medical School of Kurume Univ.), "Induction of CTL in peripheral blood lymphocytes from HLA-A26-positive healthy subjects and cancer patients with different HLA subtypes, using the SART-1 peptide", General meeting abstracts of Japanese Cancer Association). Furthermore, the 140 kD SART-3-reactive cancer-reactive CTL-inducing antigen was found to selectively express in proliferating cells and also in the

15 nucleus of cancer cells, and two nonapeptides that have CTL-inducing ability to the lymphocytes of HLA-A24-positive cancer patients were identified within the antigen (Yamana, H., Sasatomi, T., Miyagi, Y., Tou, U., Shiromizu, K., and Ito, K. (Medical School of Kurume Univ.), Japan Surgical Society (supplement) 101: 417 (2000)). In the interest of the expression of these cancer-reactive CTL-inducing antigens at the protein level in various cancers, the SART-1 antigen was expressed

20 in 60 to 80% of squamous cell carcinomas and in 40 to 50% of adenocarcinomas except for breast cancer; SART-2 in more than 60% of squamous cell carcinomas; and SART-3 in most malignant tumors including adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. In contrast, these antigens are not expressed in normal tissues except the testicle (Ito, K., Shichijo, S., and Yamana, H. (Medical School of Kurume Univ.), "Tumor immunity 9, Human cancer-specific T cell-recognized antigen

25 2, Squamous cell carcinoma-reactive CTL-inducing antigen SART-1 and peptide vaccines", Immunology Frontier 9(3): 195-204 (1999)). HLA-A26 and HLA-A\*2402 are shared in 22% and approximately 60%, respectively, in Japanese. Therefore, these peptide vaccines are expected to be applicable to many squamous cell carcinoma patients in Japan. Phase 1 clinical studies using the above peptides are being planned in Kurume Univ. (Yamana, H. and Ito, K. (Medical School of

30 Kurume Univ.), "An explanation of guideline to clinical studies", A proposal regarding the first clinical studies on tumor peptide vaccines, Cellular Molecular Medicine 1(1): 89-95 (2000)). The application of the present invention may be useful for epitopes derived from these antigen peptides.

35 An effective immunotherapy can be conducted against tumors, pathogenic infectious microorganisms, or the like, by applying genes encoding the above-described peptide antigens to the present invention. Apart from these antigens, epitopes include the cancer antigen Muc-1 and

the Muc-1-like mucin tandem repeat peptide (US Pat. No. 5,744,144), and the melanoma gp100 antigen. Immunotherapy using these genes has been applied to a variety of cancers, including breast cancers, colorectal cancers, pancreatic cancers, prostate cancers, lung cancer, etc. In addition, the gene encoding the above-mentioned tumor antigen peptide HER2 was found to be overexpressed or amplified in about 20 to 40% of cases of breast cancers, oophoromas, stomach cancers, and non-small cell pulmonary carcinomas, indicating high tendency of tumor specificity. Two nonapeptides (HER2p63-71 and HER2p780-788) originating from HER 2, which peptides are derived from dendritic cells purified from peripheral blood mononuclear cells of oophoroma patients and normal healthy subjects are exemplified as epitopes of the present invention (Eur. J. Immunol. 30: 3338-3346 (2000)). Moreover, the pharmaceutical compositions of the present invention may be applied to cancer vaccine therapy for CEA-positive progressive solid tumors using CEA epitope peptides (Kim, C. *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47: W 90-96 (1998)). For example, large amounts of peripheral blood mononuclear cells may be isolated from a patient by selected collection of blood components, dendritic cells are induced by the addition of IL-4 and GM-CSF from the mononuclear cell fraction, induced dendritic cells are then introduced with  $\beta$ 2m containing CEA epitope peptide produced by the method of the present invention or the vector itself, and finally the dendritic cells are subcutaneously administered as "DC vaccine" (Okamoto, K., Shirokazu, T., Sakakura, C., Otsuji, E., Kitamura, K., and Yamagishi, K. (Kyoto Prefectural University of Medicine), "A case of bone metastatic lung cancer wherein dissociation between serum CEA values and anti-tumor effect was achieved via CEA-specific active immunotherapy", International Association of Surgeons and Gastroenterologists).

Optionally, the present invention may be applied to general diseases. In the interest of diabetes, for example, an insulin fragment peptide may be used as an epitope to type I diabetes animal model (Coon, B. *et al.*, J. Clin. Invest. 104(2): 189-194 (1999)).

When used as vaccines, the compositions of the present invention may be administered at a quantity sufficient to at least partially induce antigen-specific cellular immune response. However, the administration dose of the protein or expression level of the gene should be determined by considering its effective level and intoxication level. The route of administration may be appropriately selected from, for example, percutaneous, pernasal, perbronchial, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, intraarticular, and subcutaneous administrations, but is not limited thereto. They may be administered local or systemically. The induction of cellular immunity can be detected by such as CTL assay as described in the present invention.

The expression levels of genes introduced into cells using the vector-containing composition may be assayed by methods known to those skilled in the art. Transcription products from the genes may be detected and/or quantified by, for example, Northern hybridization, RT-PCR, or RNA protection assay. The detection by Northern hybridization and RNA protection

assay can be also performed *in situ*. Western blotting, immunoprecipitation, RIA, ELISA, Pull-down assay, and such, using antibodies may be conducted for the detection of translation products. Moreover, for easier detection of expression products, tags may be attached to proteins to be expressed or reporter genes may be inserted into the vectors so that they are expressed.

- 5 Examples of the reporter genes include  $\beta$ -galactosidase, CAT, alkaline phosphatase, and GFP proteins; however, they are not limited thereto.

The dose of protein compositions, such as the epitope-linked- $\beta$ 2m or the MHC class I/peptide complexes, may vary depending on the disease to be treated, body weight, age, sex, and symptom of the patient, the purpose of administration, the type of the administered composition, the route of administration, and such, but it can be appropriately determined by those skilled in the art. The protein dose may be, for example, within the range of 10 ng/kg to 100  $\mu$ g/kg, preferably 100 ng/kg to 50  $\mu$ g/kg, and more preferably 1  $\mu$ g/kg to 5  $\mu$ g/kg. When a combination of multiple epitopes is used for administration, each of the epitopes may be administered at the above dose. The protein compositions such as epitope-linked- $\beta$ 2m or the MHC class I/peptide complexes may be properly combined with pharmaceutically acceptable carriers.

The dose of the vector compositions may vary depending on the disease, body weight, age, sex, symptom, purpose of administration, transgene, and such, but it can be appropriately determined by those skilled in the art. A Paramyxovirus vector is preferably administered at a concentration within the range of about  $10^5$  pfu/ml to about  $10^{11}$  pfu/ml, more preferably about  $10^7$  pfu/ml to about  $10^9$  pfu/ml, and most preferably about  $1 \times 10^8$  pfu/ml to about  $5 \times 10^8$  pfu/ml, within a pharmaceutically acceptable carrier. The dose is preferably about  $10^5$  pfu/round to  $10^{11}$  pfu/round, more preferably about  $10^7$  pfu/round to  $10^9$  pfu/round, and most preferably about  $10^8$  pfu/round to  $10^9$  pfu/round. When different vectors are administered in combination, each of the vectors may be administered in the above dose.

- 25 The compositions of the present invention may be administered to all mammalian animal, including humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, and dogs.

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows the structure of the plasmid (e/ $\beta$ 2m/pSeVb) for the construction of the SeV vector that expresses epitope-linked- $\beta$ 2m (e/ $\beta$ 2m). (A) depicts the structure of e/ $\beta$ 2m/pSeVb with an insertion of the coding sequence for e/ $\beta$ 2m at the *NotI* site of pSeV18b (+). (B) depicts the structure of  $\beta$ 2 microglobulin and epitope-linked- $\beta$ 2 microglobulin encoded by the vector. (C) depicts the nucleotide sequence of the inserted *NotI* fragment.

Fig. 2 shows the structure of the plasmid (A24fu11/pSeVb) for the construction of the SeV vector that expresses the membrane-bound form of HLA-A\*2402. (A) depicts the structure of A24full/pSeVb with an insertion of the coding sequence for A24full at the *NotI* site of



pSeV18b (+). (B) depicts the nucleotide sequence of the inserted *NotI* fragment.

Fig. 3 shows the structure of the plasmid for the construction of the SeV vector that expresses the TAP inhibitory factor. (A) depicts the structures of ICP47his/pSeVc and US6his/pSeVc with insertions of the coding sequences for ICP47his and US6hisA24full, respectively, at the *NotI* site of pSeV18c (+) (between the N and P genes). (B) depicts the nucleotide sequences of the inserted *NotI* fragments.

Fig. 4 shows the structure of the SeV vector co-expressing the epitope-linked- $\beta$ 2m (e/ $\beta$ 2m) and the TAP inhibitory protein (ICP47his or US6his). <e/ $\beta$ 2m+ICP47his>/pSeV was constructed from e/ $\beta$ 2m/pSeVb and ICP47his/pSeVc, and <e/ $\beta$ 2m+US6his>/pSeV was constructed from e/ $\beta$ 2m/pSeVb and US6his/pSeVc.

Fig. 5 shows the effect of the membrane-expressed form of the MHC class I/peptide complex. H9 cells (HLA-A\*2402-human T cell line) were co-infected with A24full/SeVb and e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb at multiplicity of infection (m.o.i.) 10 and 2, respectively (indicated as "A24full+e/Nef138- $\beta$ 2m" in the figure). As a negative control, H9 cells co-infected with A24full/SeVb and wt/SeV instead of e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb were used (indicated as "A24full+wt" in the figure). In addition, H9 cells were pulsed with a peptide, as a comparative experiment (indicated as "A24full+wt peptide pulse (10  $\mu$ l)" in the figure). Eighteen hours later, the cells were labeled with 100  $\mu$ Ci Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> for 2 hours to perform <sup>51</sup>Cr release assay using the Nef138-10-specific CTL clone. (A) shows the procedure for the assay, and (B) shows the result.

Fig. 6 shows effects of the secreted form of the epitope-linked- $\beta$ 2m. H9 cells (HLA-A\*2402 human T cell line) were infected with e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb or wt/SeV as the control at m.o.i. 2, and 3 days later, the culture supernatant was collected and filtered using a 0.22  $\mu$ m filter.

As target cells, H9 cells (HLA-A\*2402 human T cell line) were co-infected with A24full/SeVb and wt/SeV at m.o.i. 10 and 2, respectively. Eighteen hours after the infection, the target cells were labeled with 100  $\mu$ Ci Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> for 2 hours. After that, cells were pulsed with a culture supernatant containing e/Nef138- $\beta$ 2m prepared as above (closed squares), 10  $\mu$ M synthetic Nef138-10 peptide (closed diamonds) as a positive control, or a culture supernatant of wt/SeV-infected cells as a negative control (open circles). One hour later, the <sup>51</sup>Cr release assay was performed using the Nef138-10-specific CTL clone. As a comparative experiment, H9 cells were co-infected with A24full/SeVb and e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb at m.o.i. 10 and 2, respectively, and used for the assay in a similar way (closed circles). (A) shows the procedure for the assay, and (B) shows the result.

Fig. 7 shows the decrease in MHC class I/peptide complex levels on the cell surface by introducing the SeV vector expressing the TAP inhibitory protein. H9 cells were infected with ICP47his/SeVc or US6his/SeVc at m.o.i. 3, and the cells were collected 18, 24, 30, and 42 hours

after the infection, followed by staining with an anti-MHC class I antibody, and expression levels of the MHC class I/peptide complex on the cell surface were analyzed by flow cytometry (A). Values in panel (B) indicate M.F.I. (Mean Fluorescent Intensity). In addition, the dotted line indicates cells infected with an isotype control SeV, whereas the solid line indicates those infected with wild type SeV (same symbols were used in Figs. 8, 9, and 11 below). Expression of a new MHC class I/peptide complex on the cell membrane surface was inhibited due to the expression of the TAP inhibitory protein, which led to a decrease in MHC class I/peptide complex levels over time. However, the decreased levels were low, since the existing MHC class I/peptide complexes were not affected.

Fig. 8 shows the effects of acid treatment on the existing MHC class I/peptide complex. One, 3, and 6 hours after the acid treatment, MT-2 cells were stained with the anti-MHC class I antibody, and then expression levels of the MHC class I/peptide complex on the cell surface were analyzed by flow cytometry (A). The MHC class I/peptide complex levels were decreased due to the acid treatment to remove the peptide from the MHC class I/peptide complex on the cell membrane surface (B). After that, nearly the same expression levels of the MHC class I/peptide complex on the cell membrane surface before the acid treatment were recovered within about 6 hours.

Fig. 9 shows the effects of acid treatment and the introduction of an SeV vector expressing the TAP inhibitory protein on the suppression of expression of the MHC class I/peptide complex. MT-2 cells were infected with ICP47<sub>his</sub>/SeVc or US6<sub>his</sub>/SeVc at m.o.i. 3, treated with the acid 14 hours later, stained with an anti-HLA-A24 antibody 6 hours after the acid treatment. Expression levels of the MHC class I/peptide complex on the cell membrane surface were then analyzed by flow cytometry (A). As a result of the removal of the existing MHC class I/peptide complex by the acid treatment, coupled with suppression of the expression of a new MHC class I/peptide complex on the cell surface by the TAP inhibitory protein, the expression levels of the MHC class I/peptide complex on the cell surface remained low even 6 hours after the acid treatment (B).

Fig. 10 depicts photographs of the epitope-linked- $\beta$ 2m and the TAP inhibitory protein co-expressed by the SeV vectors introduced into the cells. The two proteins were detected with an anti-(His)<sub>6</sub> antibody (A) and anti- $\beta$ 2m antibody (B). These photographs show that both e/Nef138- $\beta$ 2m and US6<sub>his</sub> are expressed in the cells infected with <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6<sub>his</sub>>/SeV. Lane M, size marker; lane 1, <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6<sub>his</sub>>/SeV; lane 2, US6<sub>his</sub>/SeVc; lane 3, e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb; lane 4, e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVc; and lane 5, wt (wild type) SeV.

Fig. 11 shows the expression of the epitope-linked- $\beta$ 2m-bound MHC class I/peptide complex resulting from the introduction of the SeV vector co-expressing the epitope-linked- $\beta$ 2m and the TAP inhibitory protein. (A) shows the procedure for the assay, and (B) shows the results.

While the MHC class I/peptide complex levels on the cell surface remained low even 6 hours after the acid treatment in the cells in which the SeV vector expressing ICP47*his* or US6*his* (<e/Nef138-β2m+ICP47*his*>/SeV or <e/Nef138-β2m+US6*his*>/SeV) alone was introduced, the MHC class I/peptide complex levels on the cell surface before the acid treatment were recovered 6 hours after the acid treatment in the cells in which the SeV vector co-expressing e/Nef138-β2m and ICP47*his* or US6*his* was introduced.

#### Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention is specifically illustrated below with reference to the Examples, but is not to be construed as being limited thereto. Furthermore, all references cited throughout this specification are incorporated by reference.

#### [Example 1] Isolation of the HLA-A\*2402 gene and the human β2m gene

The HLA-A\*2402 gene, a human MHC class I gene, and the human β2m gene were cloned from messenger RNAs (mRNA) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) taken from a normal healthy subject carrying the HLA-A24. Micro-FastTrack Kit (Invitrogen) was used for the separation of mRNA and AMV-RT First-strand cDNA synthesis kit (LIFE SCIENCE) was used for the synthesis of cDNA.

Using the obtained cDNA as a template, PCR was conducted using primer sets HLA-5P2 and HLA-3B, and b2m-5' and b2m-3' for the HLA-A\*2402 and β2m genes, respectively.

HLA-5P2, 5'-GGGCGGATCCGGACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG-3' (SEQ ID NO: 7)

HLA-3B, 5'-CCGCCTCGAGCTGGGGAGGAAACAGGTCAGCATGGGAAC-3' (SEQ ID NO: 8)

b2m-5', 5'-GGCACGAGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGC-3' (SEQ ID NO: 9)

b2m-3', 5'-AATTGGAATTCATCCAATCCAAATGCGGC-3' (SEQ ID NO: 10)

PCR was carried out by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, and 72°C for 1 min, followed by extension reaction at 72° for 7 min. PCR was carried out using Ex Taq (TaKaRa). PCR products thus obtained were cloned using the pGEM-T vector system (Promega) (dubbed A\*2402/pGEM and β2m/pGEM, respectively), and their nucleotide sequences were confirmed by sequence reactions. The sequence reactions were carried out using dye terminator chemistry (Big-Dye terminator cycle sequencing Ready Reaction Kit; Applied Biosystems) by electrophoresis on AB1-377 DNA Sequencer.

#### [Example 2] Construction of epitope-linked-β2m expression vector

The following steps were performed to construct the plasmid (e/β2m/pSeVb) that encodes

an SeV vector expressing an epitope-linked- $\beta$ 2m. The insertion of the sequence for each epitope and linkers downstream of the  $\beta$ 2m signal sequence, and the attachment of E and S signals of Sendai virus and *NotI* recognition site were performed by PCR (Fig.1). The amino acid sequence of the linker (GGGSGGGSGGG/SEQ ID NO: 11) was designed to have 3 repeated sequences of GGG (SEQ ID NO: 1).

Primers used were as follows:

e/b2m-a1, 5'

-GGAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGGTTCTGGTGGAGGTTCGATCCAGCGTACTCCAAA  
GATT-3' (SEQ ID NO: 12)

10 e(Nef)-a2, 5'

-TCTGGCCTGGAGGCTAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTTCGGAGGAGGTGGC  
GGGTCC-3' (SEQ ID NO: 13)

e(Env)-a2, 5'

-TCTGGCCTGGAGGCTAGATACCTAAGGGATCAACAGCTCCTAGGGATTGGAGGTGGC  
15 GGGTCC-3' (SEQ ID NO: 14)

e/b2m-a3, 5'

-TGCGGCCGCGGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTA  
CTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCT-3' (SEQ ID NO: 15)

b2m-d, 5'

20 -TTGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTTACATGT  
CTCGATCCCACTT-3' (SEQ ID NO: 16)

PCR was carried out using  $\beta$ 2m/pGEM as a template and a set of primers, e/b2m-a1 and e/b2m-d, by 15 cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by an extension reaction at 72°C for 7 min. The obtained PCR product was used as a template for further PCR using e(Nef)-a2 or e(Env)-a2 and b2m-d under the same conditions, followed by another PCR using these products as a templates and e/b2m-a3 and b2m-d under the same conditions to obtain e/Nef138- $\beta$ 2m and e/Env584- $\beta$ 2m fragments, respectively. Each of these fragments was cloned using pGEM-T vector system (Promega) and their sequences were confirmed by sequence reactions. Then, each vector containing either of the fragments was digested with *NotI* and inserted into the *NotI*-digested site of pSeV18<sup>+</sup>b(+), and the nucleotide sequences were confirmed again. Thus, e/Nef138- $\beta$ 2m/pSeVb and e/Env584- $\beta$ 2m/pSeVb were obtained (generically dubbed as "e/ $\beta$ 2m/pSeVb"). On the other hand, Sendai virus  $\beta$ 2m/pSeVb expressing native  $\beta$ 2m alone was also constructed similarly as described above, using b2m-a (5'-TGCGGCCGCGGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3' (SEQ ID NO: 17) and b2m-d. The amino acid sequences of the Nef epitope (Nef138-10) and the Env epitope (Env584-11) are shown in SEQ ID NOs: 21 and 23, respectively.

[Example 3] Construction of vector expressing a membrane-bound form of an MHC class I heavy chain

The addition of the E and S signals of Sendai virus and the *NotI* site was performed by  
5 PCR (Fig. 2).

Primers used were as follows:

A24-a#, 5'-TGCGGCCGCGTACGCCGAGGATGGCCGTCATGGCGCCCCG-3' (SEQ ID NO:  
28)

A24-d4,

10 5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTCACACT  
TTACAAGCTGTGAG-3' (SEQ ID NO: 29)

PCR was carried out using A\*2402/pGEM as a template and a set of primers A24-a# and  
A24-d4 by 15 cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by an  
extension reaction at 72°C for 7 min, yielding A24full fragment. A24full/pSeVb was obtained  
15 similarly to the generation of e/β2m/pSeVb.

[Example 4] Construction of an expression vector for ICP47 and co-expression vector for both  
ICP47 and epitope

The ICP47 (US12) gene derived from Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) has been  
20 cloned into the plasmid US12/pGEX-5X-2 as described previously (McGeoch, D.J., Nucleic  
Acids Res. 14(4): 1727-1745 (1986)). PCR was used for the attachment of the histidine tag (his),  
the E and S signals of Sendai virus, and a *NotI* site to the ICP47 gene fragment (Fig. 3).

Primers used were as follows:

ICP-Esn,

25 5'-TGCGGCCGAGTAAGAAAACTTAGGGTCAAACGTACGGCCGAGATGTCGTGGGC  
CCTGGAAAT-3' (SEQ ID NO: 34)

ICPhis-R,

5'-TTGCGGCCGCTATCAATGGTGGTGATGGTGGTGAGCTCCACGGGTACCGGATTAC-  
3' (SEQ ID NO: 35)

30 PCR was carried out using US12/pGEX-5X-2 as a template by 15 cycles of 94°C for 1  
min, 48°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by an extension reaction at 72°C for 7 min,  
yielding ICP47his fragment. ICP47his/pSeVc was obtained similarly to the generation of  
e/β2m/pSeV by introducing the ICP47his fragment into pSeV18<sup>+</sup>c(+) (Kato, A. *et al.*, J. Virol.  
73(11): 9237-9246 (1999)).

35 e/Nef138-β2m/pSeVb and ICP47his/pSeVc were digested with *KpnI* and *SpnI* (New  
England BioLab) to yield an e/Nef138-β2m-containing fragment (4 kb) of e/Nef138-β2m/pSeVb

and an ICP47*his*-containing fragment (15 kb) of ICP47*his*/pSeVc, respectively, followed by their ligation using the Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa), yielding <e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47*his*>/pSeV (Fig. 4).

5    [Example 5] Construction of an expression vector for US6 and a co-expression vector for US6 and epitope

The human cytomegalovirus (CMV) strain AD169 solution has been described previously (Chen, Z. *et al.*, Virology 258(2): 240-248 (1999)). PCR was carried out using a DNA extract from CMV strain AD169 solution as a template (Fig.3).

10   Primers used were as follows:

US6-a, 5'-TGCGGCCGCCACTCCTTCACTATGGATCTCTTG-3' (SEQ ID NO: 36)

US6his-d1,

5'-CTACGGCGTACGTCAATGGTGGTGATGGTGGTGAGCTCCGGAGCCACAACGTCGA  
AT-3' (SEQ ID NO: 37)

15   US6his-d2,

5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTCTTACTACGGCGTACGTCA-3'  
(SEQ ID NO: 38)

PCR was carried out using a set of primers US6-a and US6his-d1 by 15 cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by an extension reaction at 72°C for 7 min, to  
20   yield a US6*his* fragment. US6*his*/pSeVc was obtained similarly to the generation of e/ $\beta$ 2m/pSeVb.

In a similar manner to that of the construction of <e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47*his*>/pSeV, <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his>/pSeV was obtained from recombination of e/Nef138- $\beta$ 2m/pSeVb and US6*his*/pSeVc (Fig. 4).

25

[Example 6] Reconstitution and infection of Sendai virus vector

pSeV18<sup>+</sup>b(+), pGEM-L, pGEM-P, pGEM-N, and vTF7-3 have been described previously (Hasan, M.K. *et al.*, J. Gen. Virol. 78: 2813-2820 (1997); Kato, A. *et al.*, EMBO. J. 16: 578-587 (1997); Yu, D. *et al.*, Genes Cells, 2: 457-466 (1997)). Reconstitution of Sendai virus  
30   vector was performed according to the methods described in the above references. The Sendai virus vectors e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb and e/Env584- $\beta$ 2m/SeVb (collectively called as e/ $\beta$ 2m/SeVb) were generated from e/Nef138- $\beta$ 2m/pSeVb and e/Env584- $\beta$ 2m/pSeVb, respectively. Furthermore, the Sendai virus vector A24full/SeVb was generated from A24full/pSeVb.

The Sendai virus vectors ICP47*his*/SeVc and <e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47*his*>/SeV were  
35   obtained from ICP47*his*/pSeVc and <e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47*his*>/pSeV, respectively. The Sendai virus vectors US6*his*/SeVc and <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6*his*>/SeV were obtained from

US6his/pSeVc and <e/Nef138-β2m+US6his>/pSeV, respectively.

Simian kidney cell lines CV-1 and LLCMK2 were cultured in MEM (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin (Life Technologies) (M10). Unless otherwise stated, CV-1 cells were infected with recombinant  
 5 Sendai virus at each indicated m.o.i and cultured in a serum-free medium for 3 days in following infection with Sendai virus.

[Example 7] Recovery and quantification of epitope-linked-β2m (e/β2m)

The culture supernatant of CV-1 cells infected with e/β2m/SeVb or β2m/SeVb (no  
 10 epitope) was centrifuged at 40,000x g to remove Sendai virus particles and the supernatant was collected.

Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for the quantification of e/β2m in the culture supernatant. 2.5 μg/ml anti-human β2 microglobulin monoclonal antibody (DAKO) was used as a capture antibody, and 500 ng/ml peroxidase-labeled anti-human  
 15 β2 microglobulin monoclonal antibody (DAKO) as a detector antibody. TMB peroxidase color development kit (BIO-RAD) was used for color development.

Purified human β2 microglobulin (Biogenesis) was used as the standard sample.

[Example 8] Establishment of an Nef 138-10-specific CTL clone

PBMC of HIV-1-infected subject carrying HLA-A\*2402 was cultured overnight at 3x  
 20 10<sup>5</sup>/96-well in 100 μl/well R10 medium. On the next day, stimulator cells (autologous PHA-blast activated in RPMI1640 (Sigma) supplemented with 0.2 μg/ml PHA (Sigma) and 10% Lymphocult-T (Biotest) (R10) overnight, irradiated at 3000 rad, and pulsed with 10 μM Nef138-10 for 1 hour) were added and cultured for 2 weeks in the presence of 1 μg/ml anti-human  
 25 CD28. The cells were further stimulated with stimulator cells (autologous Epstein-Barr virus transformed B cell line (B-LCL) irradiated at 10,000 rad and pulsed with 10 μM Nef138-10) ever 2 weeks. After 2 to 4 stimulations, when CTL activity was confirmed, the cells were cloned.

The cloning was carried out by incubating the cells at 0.8 cells/well with 1x 10<sup>5</sup> cells/well stimulator cells (autologous B-LCL irradiated at 10,000 rad and pulsed with 10 μM  
 30 Nef138-10) and 5x 10<sup>4</sup> cells/well feeder cells (PBMC from normal healthy subject irradiated at 3,000 rad) in the presence of 10% Lymphocult-T and 2.5% PHA-sup (culture supernatant of PBMC (3x 10<sup>6</sup>/ml) from normal healthy subject stimulated with 0.2 μg/ml PHA for 48 hours) for 3 to 4 weeks.

35 [Example 9] Recognition by CTL of SeV-introduced cells forming a membrane-bound form of MHC class I/peptide complex

CTL  $^{51}\text{Cr}$  release assay was performed as follows. Human  $\text{CD4}^+$  T lymphocyte cell line H9 was cultured in RPMI1640 (Sigma) supplemented with 10% FCS, 100 U/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin (R10). The cells ( $2 \times 10^3$  cells/well; target cells) were labeled with 100  $\mu\text{Ci}$  of  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  for 2 hours, washed three times with R10, and pulsed with 10  $\mu\text{M}$  peptide (Nef138-10) for an hour. When SeV vector-introduced cells were used as target cells, the cells were infected with SeV vectors in combinations as indicated in Fig. 5 at m.o.i 10:2, 17 hours before the labeling (namely, 20 hours before the addition of the effector cells). The cells of Example 8 were added as effector cells at each E:T ratio (effector cells:target cells). The cells were incubated for 4 hours at  $37^\circ\text{C}$ , and the amount of  $^{51}\text{Cr}$  released in the culture supernatant was determined using a  $\gamma$ counter. R10 and 4% Triton X-100/PBS were added instead of the effector cells for the determination of Spontaneous release and Maximum release, respectively.

Specific lysis (%) was calculated as  $(\text{cpm of each sample} - \text{cpm of Spontaneous release}) / (\text{cpm of Maximum release} - \text{cpm of Spontaneous release}) \times 100$ .

Fig. 5 shows the results of recognition by CTL of the membrane-bound form of the MHC class I/peptide complexes. It was revealed that antigen-specific CTL activation could be detected in the cells co-infected with A24full/SeVb and e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb.

[Example 10] Effect of epitope-linked- $\beta$ 2m recovered from SeV-infected cells

In order to prepare epitope-linked- $\beta$ 2m produced by SeV-infected cells, H9 cells were infected with e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb at m.o.i 2. Three days later, culture supernatant was collected and filtered, yielding a solution containing the epitope-linked- $\beta$ 2m. Similarly as in Example 9, CTL assay was carried out using H9 cells infected with A24full/SeVb as target cells to compare the effect of pulsing with peptides and that with the above-obtained epitope-linked- $\beta$ 2m-containing solution.

Fig. 6 shows the effects of epitope-linked- $\beta$ 2m. Antigen-specific CTL activity was detected upon the addition of the epitope-linked- $\beta$ 2m recovered from the culture supernatant of SeV-infected cells to the culture solution of the target cells.

[Example 11] Down regulation of the MHC class I/peptide complex on the cell surface by ICP47 or US6

Human  $\text{CD4}^+$  T lymphocyte cell line H9 cells, MT-2 cells, and mouse hybridoma A11.1M (Foung, S.K.H., *et al.*, Human Immunol. 15: 316-319 (1986)) cells were cultured in RPMI1640 (SIGMA) supplemented with 10% FCS, 100 U/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin (R10). CTL line and CTL clone induced from an HIV-1 patient were cultured in R10 medium containing 10% Lymphocult-T (Biotest).

Human  $\text{CD4}^+$  T lymphocyte cell line H9 cells were co-infected with ICP47 $_{his}$ /pSeVc and



US6his/pSeVc at m.o.i. 3, stained 18, 24, 30, and 42 hours later with an anti-MHC class I monoclonal antibody 3F10 labeled with FITC (Ancell), and then analyzed by flow cytometry. Namely, H9 cells were reacted with a 100-fold diluted anti-MHC class I antibody 3F10-FITC at 4°C for 20 min, followed by washing three times, and fixed with PBS (Phosphate Buffered Saline) containing 1% paraformaldehyde. PBS containing 2% fetal calf serum and 0.1% sodium azide was used for staining and washing. Flow cytometry was carried out using FACS Caliber (Beckton Dickinson) and analyzed using FlowJo Ver. 3.3 (Treestar).

While a significant change in the expression of the MHC class I/peptide complexes was not detected when the cells were infected with wild type SeV as a control, the MHC class I/peptide complex levels decreased over time when the cells were infected with ICP47his/SeVc or US6his/SeVc, suggesting that expression of new MHC class I/peptide complexes on the membrane surface was suppressed (Fig. 7). However, no remarkable decrease was observed due to the presence of the existing MHC class I/peptide complexes.

#### 15 [Example 12] Effect of acid treatment on the existing MHC class I/peptide complexes

Since expression of new MHC class I/peptide complexes was suppressed by the inhibition of TAP activity, the effects of acid treatment on the existing MHC class I/peptide complexes was then examined.

Acid treatment to release peptides was carried out by treating MT-2 cells (HLA-A24+) with a 200 µl peptide stripping buffer (0.13 M citric acid (pH3), 66 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 17 µg/ml Phenol Red) at 4°C for 1 min, followed by neutralization with 12 ml RPMI1640. Immediately after (0 hour), 1, 3, and 6 hours after the treatment, the cells were stained with a culture supernatant of an anti-HLA-A24 antibody-producing hybridoma A11.1M, followed by anti-mouse IgG antibody labeled with FITC (Immunotech), and analyzed by flow cytometry as described above (Fig. 8).

Peptides were shown to be removed from the MHC class I/peptide complexes on the membrane surface by the acid (pH 3) treatment, leading to a decrease in the MHC class I/peptide complex levels on the cell surface. Levels before the treatment were shown to be recovered 6 hours later.

30

#### [Example 13] Decrease in the MHC class I/peptide complex levels on the cell surface by acid treatment and using the expression vector for the TAP inhibitory protein

Since the acid treatment was shown to be effective to decrease the levels of existing MHC class I/peptide complexes, the effects of the TAP inhibitory protein on the suppression of new MHC class I/peptide complexes on the cell membrane surface was then examined, by infection of the cells with the expression vector for the TAP inhibitory protein, followed by acid treatment of

35

the cells after the TAP inhibitory protein was expressed sufficiently (14 hours after the infection) to remove the existing MHC class I/peptide complexes, and by analyzing the MHC class I/peptide complex levels on the cell membrane surface 6 hours after the acid treatment.

MT-2 cells were infected with ICP47*his*/SeVc or US6*his*/SeVc at m.o.i. 3, treated with the acid 14 hours later as described in Example 12, stained 6 hours after the treatment with the MHC class I/peptide complex (A11.1M) as described in Example 12, and analyzed by flow cytometry (Fig. 9). As a result, both ICP47 and US6 were shown to effectively suppress the expression of new MHC class I/peptide complexes on the cell surface. In addition, it was confirmed that ICP47 and US6 had nearly the same suppressive effect.

[Example 14] Co-expression of the TAP inhibitory protein and epitope-linked- $\beta$ 2m by the co-expression vector for the TAP inhibitory protein and epitope-linked- $\beta$ 2m

Western blotting was used to analyze whether the vector expressing both the TAP inhibitory protein and epitope-linked- $\beta$ 2m constructed in Example 5 actually expresses the both proteins.

CV-1 cells were infected with SeV vectors expressing e/Nef138- $\beta$ 2m and US6*his*, separately, or co-expressing both, and with wild type SeV at m.o.i. 3, and the infected cells were collected 24 hours later. The collected infected cells were lysed with TNE Buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.8), 1% NP40, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 10  $\mu$ g/ml aprotinin) and the solubilized fraction was applied to SDS-PAGE, followed by Western blotting using an anti-(His)<sub>6</sub> antibody and an anti- $\beta$ 2m antibody to confirm the expression of the US6*his* and e/Nef138- $\beta$ 2m proteins (Fig. 10). After the samples were blotted onto PVDF membrane, followed by blocking using Block Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), the membrane was reacted with the 1000-fold diluted anti-(His)<sub>6</sub> antibody, Penta-His Antibody (QIAGEN), or an anti- $\beta$ 2m antibody (Immunotech) at 4°C for one hour. After washing 4 times, the membrane was reacted with a 2000-fold diluted anti-mouse IgG antibody labeled with HRP (Roche) at room temperature for one hour, followed by washing 4 times, and allowed to color development using Lumi-Light plus substrate (Roche). Lumi Imager F1 (Boehringer Mannheim) was used for the detection. TBS-T (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20) was used for the washing and 10-fold diluted Block Ace was used for the dilution of antibodies. As a result, in the cells infected with <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6*his*>/SeV, expression of both US6*his* and e/Nef138- $\beta$ 2m was confirmed. Also, expression levels of US6*his* were almost the same as those in the cells infected with US6*his*/SeVc.

[Example 15] Recovery of the MHC class I/peptide complex by the vector co-expressing the TAP inhibitory protein and epitope-linked- $\beta$ 2m after the acid treatment

From the results of Examples 13 and 14, it is expected that, in the acid-treated cells that were infected with the vector co-expressing the TAP inhibitory protein and epitope-linked- $\beta$ 2m, expression of the MHC class I/peptide complexes displaying endogenous protein-derived epitopes on the cell membrane surface will be suppressed, resulting in a high frequency of expression of

5 MHC class I/peptide complex having an epitope-linked- $\beta$ 2m that does not require the TAP-mediated peptide transfer.

Accordingly, MT-2 cells were infected with ICP47 $_{his}$ /SeVc or US6 $_{his}$ /SeV, and <e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47 $_{his}$ >/SeV or <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6 $_{his}$ >/SeV at m.o.i. 3, treated with the acid 14 hours later as described in Example 13, stained with the MHC class I/peptide complex

10 (A11.1M) 6 hours later as in Example 13, and analyzed by flow cytometry (Fig. 11). Whereas expression of the MHC class I/peptide complexes on the cell membrane surface was suppressed in the cells infected with ICP47 $_{his}$ /SeVc or US6 $_{his}$ /SeVc, almost the same level of the MHC class I/peptide complexes as that in the cells infected with wild type SeV was recovered in the cell

15 infected with <e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47 $_{his}$ >/SeV or <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6 $_{his}$ >/SeV. This indicates that the MHC class I/peptide complex bound to epitope-linked- $\beta$ 2m is expressed in high density in the cells infected with the vector co-expressing the TAP inhibitory protein and epitope-linked- $\beta$ 2m.

#### Industrial Applicability

The present invention enabled the efficient display of a desired exogenous epitope by

20 suppressing the display of endogenous epitopes, when an epitope-linked MHC class I or  $\beta$ 2m was expressed in mammalian cells. Thus, the present invention enables a high frequency of expression of the MHC class I/peptide complex displaying a certain specific (single) epitope on the cell surface. It is possible to effectively induce a desired antigen-specific cellular immune response by applying the method of the present invention to introduce, *in vivo* or *ex vivo*, a vector

25 expressing an epitope-linked MHC class I or  $\beta$ 2m. The present invention finds utility in the induction of protective immunity against infectious diseases, gene therapy in the immunotherapy for cancers, and the like.

## CLAIMS

1. A method for enhancing exogenous epitope display on an MHC class I molecule, wherein said method comprises the steps of:
  - 5 (a) inhibiting TAP activity in a cell; and
  - (b) expressing an epitope-fused MHC class I heavy chain or an epitope-fused  $\beta$ 2m in said cell.
2. The method of claim 1, wherein said method further comprises the step of acid treatment.
- 10 3. The method of claim 1 or 2, wherein said step of inhibiting TAP activity in a cell comprises the step of contacting said cell with a protein having a TAP inhibitory activity, or the step of introducing a vector encoding said protein into said cell.
4. The method of claim 3, wherein said protein having said TAP inhibitory activity is US6 or  
15 ICP47.
5. The method of claim 3, wherein said vector is a mammalian cell-infecting virus vector.
6. The method of claim 5, wherein said vector is a Sendai virus vector.
- 20 7. A mammalian cell, wherein (i) expression of a TAP gene in said cell has been inhibited, said cell comprises a TAP inhibitor, or said cell bears a gene encoding said TAP inhibitor in an expressible way, and wherein (ii) said cell bears a gene encoding an epitope-fused MHC class I heavy chain or an epitope-fused- $\beta$ 2m in an expressible way.
- 25 8. A kit for displaying an epitope comprising: (i) a TAP inhibitor or a vector capable of expressing said inhibitor; and (ii) an epitope-fused MHC class I heavy chain or an epitope-fused  $\beta$ 2m, or a vector capable of expressing said epitope-fused MHC class I heavy chain or said epitope-fused  $\beta$ 2m.
- 30 9. A vector capable of expressing both (i) and (ii):
  - (i) a TAP inhibitor; and
  - (ii) an epitope-fused MHC class I heavy chain or an epitope-fused  $\beta$ 2m.

## ABSTRACT

The present invention relates to methods for enhancing exogenous epitope display on an MHC class I molecule through inhibition of TAP activity. Mammalian cell-infecting virus  
5 vectors encoding both a TAP inhibitory factor and an epitope-linked- $\beta$ 2m were constructed and introduced into mammalian cells. The present inventors succeeded in displaying on the cell surface in high frequency the MHC class I/peptide complex containing an epitope-linked- $\beta$ 2m expressed from the vector by reducing endogenous MHC class I/peptide complexes by the action of the TAP inhibitory factor. The present invention finds utility in vaccine therapies for infectious  
10 diseases, cancers, and the like.